



Etude structurale et fonctionnelle de PscE:PscF:PscG, un hétérotrimère nécessaire à la biogenèse de l'aiguille de sécrétion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*

Manuelle Quinaud

► To cite this version:

Manuelle Quinaud. Etude structurale et fonctionnelle de PscE:PscF:PscG, un hétérotrimère nécessaire à la biogenèse de l'aiguille de sécrétion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00182833

HAL Id: tel-00182833

<https://theses.hal.science/tel-00182833>

Submitted on 29 Oct 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Physique — Spécialité Cristallographie et RMN
Biologiques

présentée et soutenue publiquement

par

Manuelle QUINAUD

le 25 septembre 2007

ÉTUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE
PscE:PscF:PscG, UN HÉTÉROTRIMÈRE NÉCESSAIRE A LA
BIOGENÈSE DE L'AIGUILLE DE SÉCRÉTION DE TYPE III
CHEZ *Pseudomonas aeruginosa*

JURY

Eva PEBAY PEYROULA	Présidente du jury
Ariel BLOCKER	Rapporteur
Arnaud DUCRUIX	Rapporteur
Carlo PETOSA	Examineur
Andréa DESSEN	Directrice de thèse

Thèse préparée dans le Laboratoire des Protéines Membranaires
Institut de Biologie Structurale, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France
UMR 5075 ; CEA/CNRS/UJF
Partnership for Structural Biology (PSB)

Études structurales et fonctionnelles de PscE:PscF:PscG, un hétérotrimère nécessaire à la biogenèse de l'aiguille de sécrétion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*

Résumé : Le système de sécrétion de type III est présent chez plusieurs pathogènes à Gram négatif chez qui cette véritable nanomachine est impliquée dans le transport de molécules de virulence directement des bactéries vers le cytoplasme des cellules-cible. *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie dont l'aiguille de sécrétion de type III est étudiée dans cette thèse, est responsable de nombreuses maladies nosocomiales ainsi que d'infections chez les patients atteints de mucoviscidose. Ce système de sécrétion est composé d'une base ancrée dans la double membrane bactérienne et d'une structure creuse en forme d'aiguille qui est un homopolymère d'une petite protéine.

Dans le cytoplasme bactérien, la protéine PscF qui forme l'aiguille de type III chez *P. aeruginosa* est stabilisée avant sa sécrétion par 2 chaperonnes distinctes ; PscE et PscG. Ceci est nécessaire à la fonctionnalité du système de sécrétion de type III.

La structure cristallographique à 2.0 Å de résolution du complexe hétérotrimérique PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG révèle que le domaine C-terminal de la protéine de l'aiguille PscF, impliqué dans le processus de polymérisation, est enfoui dans une cavité hydrophobe de la protéine PscG repliée de façon semblable à un domaine TPR. Ceci montre que le repliement macromoléculaire nécessaire pour stabiliser la protéine de l'aiguille de type III est différent de celui décrit chez le pilus de type IV et le flagelle. Les résidus qui précèdent l'hélice C-terminale de PscF sont maintenus dépliés par des interactions hydrophobes avec PscG. Ainsi, avant sa sécrétion, PscF est maintenue partiellement dépliée par ses chaperonnes. Elle transiterait ensuite sous forme partiellement dépliée à travers l'aiguille avant de se replier lors de sa polymérisation.

La rupture des interactions spécifiques entre PscG et PscF entraîne une nette baisse de la cytotoxicité de la bactérie envers une lignée de macrophages, ce qui indique que cet hétérotrimère essentiel, qui possède des homologues chez une grande variété de pathogènes, est une cible thérapeutique attractive pour le développement de nouveaux médicaments.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, aiguille de sécrétion de type III, fibre, chaperonne, repliement TPR, cristallographie des rayons X.

Structural and functional studies of PscE:PscF:PscG, a heterotrimeric complex involved in the biogenesis of the type III secretion needle in *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract : Type III secretion systems are found in several Gram-negative bacteria. These nanomachines are involved in the transport of virulence effectors directly into the cytoplasm of target cells. *Pseudomonas aeruginosa*, whose type III secretion needle is studied here, is the causative agent of a large number of nosocomial and chronic infections in cystic fibrosis patients. This system is composed of a base anchored in the double bacterial membrane and a hollow needle formed by a single polymerized protein (PscF in *P. aeruginosa*).

Within the bacterial cytoplasm, PscF requires two distinct chaperones for stabilisation before its secretion, without which the entire system is nonfunctional.

The 2.0 Å X-ray crystal structure of the PscE:PscF^{55–85}-PscG ternary complex reveals that the C-terminus of the needle protein PscF, which is essential for needle polymerisation, is engulfed within the hydrophobic groove of the TPR-like molecule PscG. This indicates that the macromolecular scaffold necessary to stabilize the needle protein is totally distinct from chaperoned complexes between pilus- or flagellum-forming molecules.

Disruption of specific PscG:PscF interactions leads to impairment of bacterial cytotoxicity toward macrophages, indicating that this essential heterotrimer, which possesses homologs in a wide variety of pathogens, is an attractive therapeutic target for the development of novel drugs.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, type III secretion needle, fibre, chaperone, TRP fold, X-ray crystallography.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Andréa Dessen pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces 3 ans. Merci Andréa de m'avoir introduit dans l'univers passionnant des structures de protéines et en particulier de ce magnifique système de sécrétion de type III. Merci surtout de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié un si beau sujet.

Un merci particulier à Viviana Job qui m'a tout appris à la paillasse et à qui je dois tous les mutants réalisés en un temps record. Merci Vivi pour ta patience, tes conseils et tes encouragements quotidiens et surtout ta gentillesse et ton amitié.

Merci à Ina Attree et son équipe, en particulier Sophie Plé, avec qui nous avons eu une collaboration très enrichissante pendant ces 3 années. Sans votre énorme contribution l'intérêt de notre travail aurait été bien moindre.

Je remercie Eva Pebay-Peyroula, Ariel Blocker, Arnaud Ducruix et Carlo Petosa pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Merci pour temps que vous y avez consacré. Je remercie tout particulièrement Ariel pour sa relecture très attentive du manuscrit et ses remarques avisées.

Merci à Richard Kahn et Guillaume pour nous avoir fait espérer du signal anomal dans nos cristaux trempés avec vos composés. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Merci à Stéphane Torelli pour avoir synthétisé les dérivés de térephtalamides. Merci pour ton enthousiasme, ta gentillesse et ton énergie qui m'ont fait tant plaisir. Je compte sur toi, on arrivera à le trouver cet inhibiteur!

Merci à tous les membres du laboratoire auprès de qui j'ai passé 3 années très agréables. Pauline, Meike, merci pour votre soutien. Clo, bonne chance pour la suite de ta thèse. PJ, tu finiras par l'appriivoiser cette PopB! N'en fait pas trop quand même. Alex, merci pour ta bonne humeur. Cécile, Andréas, Véro, Hugues, Iulia, Céline, Carmen et tous les autres, merci pour m'avoir accompagnée tout au

long de cette thèse. Je vous souhaite bonheur et réussite.

Merci à mes parents et à toute ma famille, en particulier Mamie, pour votre soutien pendant toutes ces années d'études. Merci pour m'avoir fait confiance et m'avoir toujours encouragée à suivre la voie que j'avais choisie.

Merci aux parents de Vincent pour leur gentillesse et leur soutien.

Quant à toi Vincent, à qui j'ai un peu fait vivre une seconde thèse, je t'adresse mes plus tendres remerciements pour ta patience et tout ce que tu as fait pour moi. Si je ne te dédie pas cette thèse, je te dédie les années à venir.

Manu

Table des matières

I	Introduction	19
1	Présentation, cadre et objectifs du projet de thèse	23
II	État de l’art	27
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.1	Description	29
2.2	Organisation en biofilms	30
2.3	” <i>Quorum sensing</i> ”	31
2.4	Infections dues à <i>P. aeruginosa</i>	32
2.5	Facteurs de virulence	32
2.5.1	Facteurs de virulence sur la surface bactérienne	32
2.5.2	Facteurs de virulence sécrétés	33
2.5.3	Toxines du système de sécrétion de type III	34
2.6	Traitement des infections par <i>P. aeruginosa</i>	34
2.6.1	Traitements anti-inflammatoires	34
2.6.2	Traitements antibiotiques	35
2.7	Résistance aux antibiotiques	35
2.8	Conclusions sur <i>P. aeruginosa</i>	36
3	Les différents systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif	37
3.1	Le système de sécrétion de type I (T1SS)	38
3.2	Le système de sécrétion de type II (T2SS)	40
3.3	Le système de sécrétion de type III (T3SS)	42
3.4	Le système de sécrétion de type IV (T4SS)	43

3.5	Le système de sécrétion de type V (T5SS), famille des autotrans- porteurs	46
3.6	Le système de sécrétion de type VI (T6SS)	47
3.7	Conclusions sur les différents systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif	48
4	Connaissances structurales et fonctionnelles sur le système de sécrétion de type III (T3SS)	49
4.1	Origine	49
4.2	Variabilité et conservation	50
4.3	Description de l'injectisome	51
4.3.1	La base	53
4.3.2	L'ATPase	56
4.3.3	L'aiguille de sécrétion	61
4.3.4	"Plate-forme" à l'extrémité de l'aiguille	71
4.3.5	Le pore de translocation	74
4.4	Connaissances structurales et fonctionnelles sur les chaperonnes du T3SS	76
4.5	Conclusions sur le système de sécrétion de type III	78
5	Connaissances sur le pilus de type IV (T4P)	81
5.1	Description générale et fonctionnalité	81
5.2	Structure de la piline; brique élémentaire pour l'assemblage de la fibre	83
5.2.1	Structure générale du monomère	83
5.2.2	L'hélice α N-terminale	85
5.2.3	La tête globulaire C-terminale	85
5.2.4	La région D	85
5.2.5	La boucle α - β	86
5.3	Description du modèle assemblé du pilus de type IV	86
5.4	Vers un modèle d'assemblage/désassemblage	88
5.5	Conclusions sur le pilus de type IV	88
6	Connaissances sur le flagelle	91
6.1	Description générale	91

6.1.1	Structure de la flagelline	94
6.1.2	Structure du protofilament	97
6.2	Description de l'assemblage	97
6.2.1	Modèle d'assemblage du flagelle	98
6.3	Conclusions sur le flagelle	102

III Matériel et méthodes 103

7 Techniques de biologie moléculaire et biochimie 105

7.1	Biologie moléculaire	105
7.1.1	Clonage	105
7.1.2	Mutagenèse dirigée	106
7.2	Biochimie	107
7.2.1	Croissance cellulaire et surexpression de la protéine d'intérêt	107
7.2.2	Etapes de purification	107

8 Analyses biophysiques 109

8.1	Séquençage N-terminal	109
8.2	Pontage chimique	110
8.3	Spectrométrie de masse	111
8.3.1	Principe	111
8.3.2	Ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ioni- sation)	111
8.3.3	Ionisation electrospray	112
8.3.4	Spectrométrie de masse native	112
8.4	Diffusion dynamique de lumière (DLS)	113
8.5	Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD)	114
8.5.1	Principe	114
8.5.2	Acquisition des données	115
8.5.3	Interprétation des résultats	117
8.6	Microscopie électronique	118
8.6.1	Principe	118
8.6.2	Mise en oeuvre expérimentale	118
8.7	Spectrométrie RMN 1D	118

9	Méthodes de microbiologie et biologie cellulaire	121
9.1	Test de cytotoxicité	121
9.1.1	Préparation de <i>P. aeruginosa</i> et des macrophages	121
9.1.2	Infection	122
9.1.3	Révélation	122
9.2	Lavage d'aiguilles chez <i>P. aeruginosa</i>	123
10	Résolution de la structure d'une protéine par cristallographie aux rayons X	125
10.1	Les rayons X et les cristaux de protéine	125
10.2	Cristallogénèse et description des cristaux	126
10.2.1	Cristallogénèse	126
10.2.2	Réseaux cristallins	128
10.3	Diffusion d'une onde plane monochromatique	129
10.4	Diffraction des rayons X par un cristal de protéines	130
10.5	Difficultés liées à la résolution de l'équation régissant la densité électronique	131
10.5.1	Erreurs de troncature	131
10.5.2	Problème de la phase	132
10.6	Méthodes de détermination de la phase des réflexions	132
10.6.1	Remplacement isomorphe multiple (MIR)	132
10.6.2	Diffusion anormale	134
10.7	Acquisition et traitement des données	134
10.7.1	Cryo-protection et collecte des données	134
10.7.2	Indexation et intégration des taches de diffraction	135
10.7.3	Mise à l'échelle et réduction des données	135
10.7.4	Recherche de la position des atomes lourds et phasage	136
10.7.5	Remplacement moléculaire	137
10.7.6	Affinement	137
IV	Résultats et discussion	141
11	Comportement de PscF sauvage	143

12	Forme monomérique de PscF	145
12.1	Construction et caractérisation d'un mutant monomérique de PscF	145
12.2	Essais de cristallogénèse	148
13	Complexe ternaire PscE:PscF:PscG	151
13.1	Identification de PscE:PscF:PscG, cytoplasmique et soluble	152
13.1.1	Identification de PscE:PscF:PscG	152
13.1.2	Etude de PscE:PscF:PscG chez <i>P. aeruginosa</i>	153
13.2	Caractérisation fonctionnelle de PscE:PscF:PscG	154
13.3	Co-stabilisation de PscE, PscF et PscG	155
14	Détermination de la structure 3D de PscE:PscF:PscG	161
14.1	Essais de cristallogénèse sur le complexe ternaire entier	161
14.2	Détermination d'une partie plus stable du complexe ternaire	162
14.3	Cristallogénèse de PscE-PscF ⁵⁵⁻⁸⁵ -PscG	163
14.4	Collecte des données et indexation	164
14.5	Reconstruction du modèle et affinement	165
15	Description de la structure de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG	169
15.1	Description générale	169
15.2	PscG : chaperonne de PscF	171
15.3	PscE, agent stabilisateur de PscG	174
15.4	PscF	176
16	Étude des rôles de PscE, PscF et PscG	179
16.1	Étude fonctionnelle de PscF ⁵⁵⁻⁸⁵	179
16.1.1	Étude fonctionnelle des résidus hydrophobes de l'hélice H de PscF	179
16.2	Rôle du domaine concave hydrophobe de PscG	186
16.2.1	Rôle de stabilisation du complexe ternaire	187
16.2.2	Rôle de ces résidus hydrophobes vis à vis de la cytotoxicité de <i>P. aeruginosa</i>	188
16.3	Étude fonctionnelle de l'hélice Ha de PscE	190

V	Conclusions et Perspectives	193
17	Conclusions de ce travail de thèse	195
18	Perspectives de ces recherches	199
18.1	D'un point de vue fondamental : Fonction de PscE et mécanismes de dissociation du complexe ternaire	199
18.1.1	Recherche d'une interaction entre PscN et PscE:PscF:PscG .	199
18.1.2	Recherche d'autres partenaires de PscE:PscF:PscG	200
18.2	D'un point de vue appliqué : Étude des interfaces protéine-protéine comme nouvelle cible pour l'antibiothérapie	201
18.2.1	Interface PscE-PscG	202
18.2.2	Interface PscF-PscG	203
VI	Annexes	209
A	Abréviations	211
B	Table des constructions réalisées	213
C	Amorces utilisées pour la mutagenèse	215
D	Publications	219
	QUINAUD <i>et al.</i> (2005) <i>J. Biol. Chem.</i>	219
	QUINAUD <i>et al.</i> (2007) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A</i>	229
	Références bibliographiques	237

Liste des figures

Figure I : Une bactérie injecte des toxines dans une cellule-cible via l'injectisome de sécrétion de type III	22
Figure 1.1 : Schéma des opérons de sécrétion et de translocation du T3SS de <i>P. aeruginosa</i>	25
Figure 2.1 : <i>P. aeruginosa</i> forment un biofilm	29
Figure 3.1 : Représentation schématique du système de sécrétion de type I	39
Figure 3.2 : Représentation schématique du système de sécrétion de type II	41
Figure 3.3 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III chez <i>P. aeruginosa</i>	44
Figure 3.4 : Représentation schématique du système de sécrétion de type IV	45
Figure 3.5 : Représentation schématique du système de sécrétion de type V correspondant aux autotransporteurs	46
Figure 3.6 : La protéine Hcp1	47
Figure 4.1 : Représentation schématique du flagelle bactérien et du système de sécrétion de type III	50
Figure 4.2 : Visualisation du sécréton	53
Figure 4.3 : Modèle par cryo-microscopie électronique de la base de l'injectisome de type III de <i>S. typhimurium</i>	54
Figure 4.4 : Modélisation de l' assemblage en anneau de 24 sous-unités de EscJ	55

Figure 4.5 : Modèle de dissociation par l'ATPase des complexes protéiques chaperonne:substrat qui précède la sécrétion du substrat	58
Figure 4.6 : Structure cristallographique du monomère tronqué de l'ATPase et modèle de la forme hexamérique assemblée en anneau	60
Figure 4.7 : Alignement de séquence entre PscF chez <i>P. aeruginosa</i> et des protéines orthologues	61
Figure 4.8 : Structure cristallographique de MxiH ^{Δ5} dotée d'un C-ter replié	64
Figure 4.9 : Description de l'assemblage de MxiH au sein de l'aiguille de sécrétion de type III de <i>S. flexneri</i>	65
Figure 4.3.3 : Alternative dynamique au modèle de la règle moléculaire	68
Figure 4.3.3 : Modèle de polymérisation simultanée de la tige interne de la base et de l'aiguille de sécrétion	70
Figure 4.12 : Structure cristallographique de LcrV	72
Figure 4.13 : Structure cristallographique de EspA en complexe avec sa chaperone CesA	74
Figure 4.14 : Modèle proposé pour la formation du pore de translocation chez <i>P. aeruginosa</i>	75
Figure 4.15 : Structures cristallographiques de molécules destinées à polymériser (EspA et FliC) maintenue sous forme monomérique par leur chaperonne	79
Figure 5.1 : Visualisation des pili de type IV	82
Figure 5.2.1 : Structure cristallographique de la piline GC	84
Figure 5.3 : Modélisation de la surface du pilus de type IV	87
Figure 6.1 : Schéma de l'assemblage du flagelle bactérien	92
Figure 6.2 : Filament et coiffe du flagelle observés par microscopie électronique	95
Figure 6.3 : Structure du monomère de flagelline F41	96
Figure 6.4 : Structure cristallographique de F41	99
Figure 6.5 : Modèle proposé pour l'addition des monomères de flagelline	101
Figure 8.1 : Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques de l'organisation en structure secondaire d'une protéine	114
Figure 8.2 : Analyse de spectres de RMN-1D	120

Figure 10.1 : Processus de cristallogenèse	127
Figure 10.2 : Représentation schématique de la modification du vecteur d'onde suite à la diffusion d'une onde par 2 points M et M'	129
Figure 10.3 : Diagramme d'Argand pour la méthode MIR	133
Figure 11.1 : Polymérisation spontanée de PscF surexprimée chez <i>E. coli</i>	143
Figure 12.1 : Etudes biophysiques et fonctionnelles de la forme monomérique de PscF; PscF ¹⁻⁶⁷	147
Figure 12.2 : Cristaux de PscF ¹⁻⁶⁷	148
Figure 13.1 : Alignement de séquence de PscE et PscG chez d'autres bactéries	157
Figure 13.2 : Mise en évidence de PscE:PscF:PscG et localisation des 3 protéines chez <i>P. aeruginosa</i>	158
Figure 13.3 : Nécessité de la présence conjointe de PscE, PscF et PscG pour la cytotoxicité de <i>P. aeruginosa</i>	159
Figure 13.4 : Dénaturation thermique de PscE, PscF, PscG, PscE:PscG et PscE:PscF:PscG suivie par spectrométrie de dichroïsme circulaire	160
Figure 14.1 : Cristaux de PscE:PscF:PscG	162
Figure 14.2 : Représentation schématique du complexe PscE:PscF ⁵⁵⁻⁸⁵ :PscG	163
Figure 14.3 : Cristaux de PscE:PscF ⁵⁵⁻⁸⁵ -PscG	164
Figure 14.4 : Spectre d'absorption théorique du Nickel en fonction de l'énergie des rayons X	166
Figure 15.1 : Structure cristallographique de PscE:PscF ⁵⁵⁻⁸⁵ -PscG	170
Figure 15.2 : Alignement de séquence de PscE, PscF et PscG	172
Figure 15.3 : Superposition de PscG et du domaine TPR1 de HOP	173
Figure 15.4 : Interfaces hydrophobes entre PscG et ses partenaires PscF et PscE	173
Figure 15.5 : Interactions de PscE avec ses partenaires PscF et PscG	175
Figure 15.6 : Hélice amphiphile C-terminale de PscF et son interaction avec la surface concave du domaine TPR de PscG	176
Figure 16.1 : Mutations par paires de résidus hydrophobes alignés dans l'hélice H de PscF	180

Figure 16.2 : Conservation des résidus hydrophobes de l'hélice am- phiphile de PscF	181
Figure 16.3 : Les résidus hydrophobes de l'hélice H sont impliqués dans la polymérisation de PscF	182
Figure 16.4 : Les mutations dans la zone hydrophobe de l'hélice H diminuent la stabilité de la fibre formée	183
Figure 16.5 : Les mutations de résidus hydrophobes de l'hélice H en lysines diminuent la cytotoxicité de <i>P. aeruginosa</i>	185
Figure 16.6 : Conservation des résidus du domaine concave hydro- phobe de PscG	186
Figure 16.7 : Effets des simples et doubles mutations dans la main hydrophobe de PscG sur la stabilité des complexes formés avec ses partenaires	187
Figure 16.8 : Effets des simples et doubles mutations dans la main hydrophobe de PscG sur la cytotoxicité de <i>P. aeruginosa</i>	189
Figure 16.9 : L'hélice Ha ne joue au plus qu'un rôle mineur pour la cytotoxicité	191
Figure 18.1 : Portions de l'hélice α de PscF dont la séquence cor- respond à celle des peptides	204
Figure 18.2 : Composés qui miment une hélice α amphiphile	205

Liste des tables

Table 4.1 : Protéines orthologues dans les systèmes de sécrétion de type III	52
Table 14.1 : Statistiques pour la collecte des données, le phasage et l’affinement de la structure de PscE:PscF ^{55–85} :PscG	167

Première partie

Introduction

Avant propos

L'étude de nano-machines est passionnante, et d'autant plus lorsqu'elles sont un élément-clé de mécanismes biologiques à l'origine de graves infections chez l'homme causées par certaines bactéries des plus virulentes.

Parmi elles, *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 10% des maladies nosocomiales¹. Ceci fait de cette bactérie un véritable fléau au sein des infrastructures hospitalières notamment. Cette bactérie cause également de nombreuses infections chez les grands brûlés ou les personnes immuno-déprimées. Enfin, elle colonise les poumons des malades atteints de mucoviscidose chez qui elle est à l'origine d'infections chroniques très graves et, à terme, fatales. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la virulence de ces bactéries apporterait une aide précieuse à la lutte contre ce problème de santé publique majeur.

Un autre exemple remarquable est *Yersinia pestis*, bactérie responsable de la peste. Elle a décimé la population européenne lors de l'épidémie de la Peste Noire qui a causé 25 millions de morts au XIV^{ème} siècle en Europe (25% de la population européenne) et est encore une menace permanente. En effet, cet agent peut se disséminer très rapi-

¹Infection nosocomiale : infection non détectée lors de l'admission à l'hôpital et qui se développe au moins 48h après l'admission. Elles sont principalement dues aux techniques invasives utilisées pour le diagnostic et le traitement en milieu hospitalier et sont responsables de 4000 décès par an en France (source Institut de Veille Sanitaire, 18 janvier 2007)

dement parmi les populations et il n'existe pas à ce jour de traitement efficace.

Pour leur virulence et aux premiers stades de l'infection, ces bactéries synthétisent au niveau de leur membrane bactérienne une nanomachine en forme de seringue, appelée injectisome de sécrétion de type III (État de l'art, chapitre 4), qui lui permet d'injecter dans des cellules-cible des toxines, molécules destinées à perturber le fonctionnement de la cellule infectée et visant *in fine* à la détruire (figure 1).

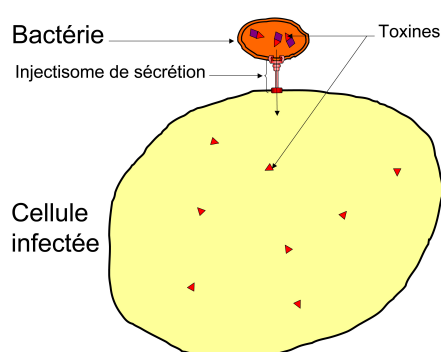


FIG. 1 – *Une bactérie injecte des toxines dans une cellule-cible via l'injectisome de sécrétion de type III.*

Au laboratoire d'Andréa DESSEN et en collaboration avec l'équipe d'Ina ATTRÉE (IRTSV) nous étudions le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*, très similaire à celui de *Y. pestis* puisqu'il existe des homologies de séquence importantes entre les protéines orthologues.

Les travaux présentés dans cette thèse se situent au niveau de l'aiguille de sécrétion dont ils visent à expliquer les mécanismes de biogénèse dans le but de pouvoir bloquer la formation de cette aiguille ou de la rendre non fonctionnelle et donc d'affaiblir la pathogénicité de telles bactéries.

Chapitre 1

Présentation, cadre et objectifs du projet de thèse

Cette thèse a pour finalité une étude structurale et fonctionnelle du complexe protéique formé par PscF et ses 2 partenaires PscE et PscG dans le cytoplasme bactérien. PscF est une protéine de 9396 Da qui est sécrétée et polymérise afin de former l’aiguille de sécrétion du système de sécrétion de type III chez *P. aeruginosa*.

Ces travaux de thèse ont été menés dans le Laboratoire des Protéines Membranaires (LPM) au sein de l’Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (IBS), et le moyen d’étude choisi a été la cristallographie des protéines aux rayons X. Cependant, d’autres techniques sont utilisées à l’institut, notamment la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), technique ne nécessitant pas l’obtention de cristaux de protéines mais ne permettant que la résolution de structures de protéines relativement petites (moins de 40 kDa), ainsi que la microscopie électronique, qui ne permet pas d’atteindre la résolution atomique mais permet la description d’assemblages plus gros et qui, dans le cadre de ce travail de thèse, s’adapte bien à la description des fibres de PscF (Résultats, Chapitre 11).

Auparavant, des travaux de l’équipe d’Ina ATTRÉE [Pas2005] ont montré que PscF est nécessaire à la sécrétion de l’effecteur ExoS, des translocateurs PopB et PopD ainsi que de PcrV, et donc à la cytotoxicité de *P. aeruginosa* (Etat de l’art, chapitre 4). PscF est, en outre, le principal constituant de l’aiguille de sécrétion

de type III de *P. aeruginosa* et polymérise *in vivo* pour former des structures d'environ 60-80 nm de long et 7-8 nm de large.

Peu de données étaient donc connues au début de cette thèse sur PscF ou ses éventuels partenaires, et notamment aucune donnée structurale.

In vitro, la surexpression de PscF conduit à la formation de fibres et l'hétérogénéité de la préparation compromet l'étude structurale à haute résolution. Seule l'obtention d'une forme homogène (monomère ou petit oligomère) permettrait cette étude structurale. Pour cela 2 approches sont envisageables :

1. La première consiste à supprimer le domaine d'interaction entre monomères afin d'obtenir une forme monomérique tronquée de la protéine d'intérêt compatible avec la résolution de sa structure à haute résolution.
2. La deuxième consiste à identifier des protéines partenaires (si elles existent) qui joueraient le rôle de chaperonnes en maintenant la protéine à étudier sous une forme monomérique, ce qui empêcherait son agrégation ou sa polymérisation prématurée. Le complexe soluble ainsi isolé pourrait ensuite être soumis à une étude structurale à haute résolution afin de déterminer le mode d'interaction entre ces protéines, et ainsi d'étudier les mécanismes développés par la bactérie afin de bloquer l'agrégation ou la polymérisation prématurée de PscF dans le cytoplasme bactérien.

En ce qui concerne la deuxième possibilité, les partenaires éventuels de PscF pourraient être recherchés parmi les protéines codées dans le fragment *pscEFGHI* de l'opéron de sécrétion *exsD-pscBCDEFGHIJKL* (figure 1.1), cloné dans pET-15b par Ina ATTRÉE (iRTSV) et dont nous disposons au début de cette thèse.

Une meilleure compréhension de la biogenèse de l'aiguille de sécrétion de type III permettrait, à terme, de pouvoir lutter plus efficacement contre les pathogènes qui utilisent ce système de sécrétion.

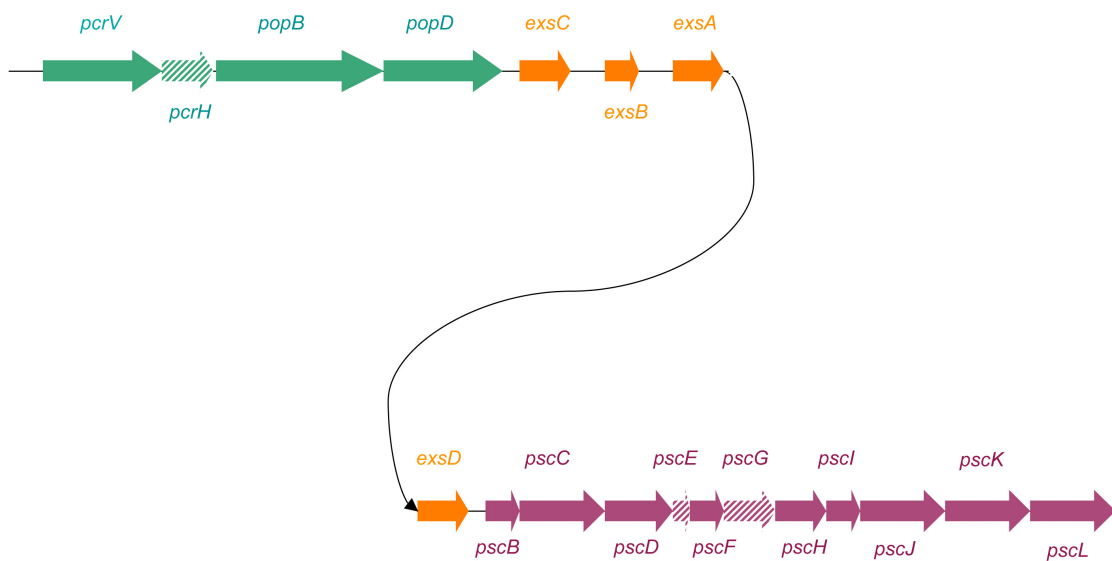


FIG. 1.1 – *Schéma des opérons de sécrétion et de translocation du T3SS de P. aeruginosa*. Les gènes de l'opéron de translocation sont colorés en vert, ceux de l'opéron de sécrétion en violet et ceux des protéines régulatrices en orange. Les chaperonnes sont de plus hachurées.

Deuxième partie

État de l'art

Chapitre 2

Pseudomonas aeruginosa

Dans cette section nous exposerons brièvement quelques caractéristiques de *P. aeruginosa*, ainsi que des mécanismes de virulence qui lui permettent d'infecter des cellules-cible.

2.1 Description



FIG. 2.1 – *P. aeruginosa* forment un biofilm (image extraite de www.cellsalive.com).

Cette bactérie à Gram négatif est largement répandue dans notre environnement quotidien [Gre1974] et se présente sous la forme de batonnets d'1 μm de long environ. Elle peut coloniser l'eau, les sols humides ou les végétaux sous sa forme saprophyte¹ ou encore le tube digestif de l'homme sous sa forme commen-

¹saprophyte : se dit d'un organisme qui se nourrit de matière organique en décomposition.

sale² [Gov1986]. Le génome de la souche PAO1 a été séquencé en 2000 [Sto2000]. Depuis, les génomes d'autres souches de *P. aeruginosa* ont été séquencés. Ils sont très conservés. La plupart des gènes codant pour les protéines impliquées dans la virulence sont en particulier présents dans toutes les souches étudiées [Wol2003].

Cette bactérie est très mobile grâce à son flagelle polaire. Son métabolisme est respiratoire ; elle utilise l'O₂ comme accepteur final d'électrons. Elle n'est cependant pas strictement aérobie puisqu'en absence d'O₂, elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons [Vas1986].

P. aeruginosa est très tolérante face à son environnement. En effet, elle supporte des températures jusqu'à 43°C. Elle peut utiliser comme nutriments plus de 50 composés organiques et est capable de se développer en présence de désinfectants [Vas1986]. Ceci explique la haute fréquence d'apparition et le caractère opportuniste de ce pathogène.

P. aeruginosa a été isolée de tissus infectieux humains par GESSARD en 1882, qui l'a nommée *Bacillus pyocyaneus* en raison des bâtonnets de couleur bleu qu'il a observés et qui est due à la production par *P. aeruginosa* de la pyocyanine, un pigment de couleur bleue en solution aqueuse à pH neutre ou basique [Lyc2000]. Dans les tissus infectés, *P. aeruginosa* se présente le plus souvent sous la forme de biofilms (figure 2.1) [Chi2000].

2.2 Organisation en biofilms

Au sein du biofilm, les bactéries adhèrent à une surface et sont protégées par une matrice d'exopolysaccharides, essentiellement des alginates dans le cas de *P. aeruginosa*. Cette matrice est en outre prédominante en terme de volume puisqu'elle occupe 85% environ du volume du biofilm [Fil2003]. De telles organisations sont privilégiées dans la nature, et c'est en outre sous cette forme que 65% des infections bactériennes s'établissent chez l'homme [Chi2000].

La première phase de la mise en place du biofilm consiste en une étape d'attachement durant laquelle le flagelle bactérien ainsi que les pili de type IV, qui seront décrits en détail ultérieurement, jouent un rôle majeur [Fil2003, O'T1998]. Dans une seconde phase une association stable entre les bactéries et leur support

²commensale : se dit d'un organisme parasite mais qui ne cause pas de trouble chez son hôte.

se met en place, puis les bactéries se différencient en fonction de leur localisation à l'intérieur du biofilm [Fil2003].

Dans un biofilm, les bactéries ont une croissance ralentie, ce qui leur permet de survivre dans des environnements hostiles [Gil1990]. Des canaux aqueux à l'intérieur même du biofilm permettent d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments vers les bactéries, et d'autre part d'éliminer les déchets. Alors que les cellules en surface sont en aérobie, à la base du biofilm elles se développent en quasi anaérobie. Ce gradient d'oxygène s'accompagne en outre d'un gradient similaire en nutriments. Cette observation suggère que le métabolisme des bactéries dépend de leur localisation à l'intérieur du biofilm, ce qui est une forme de différenciation cellulaire [Fil2003].

2.3 "Quorum sensing"

Le "quorum sensing" est un outil de communication entre les bactéries inter ou intra espèces [Win2002] qui repose sur la diffusion de petites molécules à travers les membranes bactériennes. C'est un véritable langage qui est crucial pour la formation du biofilm bactérien [Dav1998] et la pathogénicité de systèmes animaux [LB2006].

Chez les bactéries à Gram négatif, les molécules qui diffusent appartiennent le plus souvent à la famille des acylhomosérines lactones (AHL). Ces molécules sont synthétisées constitutivement chez les bactéries et, lorsque leur concentration atteint un seuil critique, elles induisent ou répriment l'expression de nombreux gènes. 6 à 10% des gènes de *P. aeruginosa* qui codent pour des protéines impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux ou dans la virulence sont ainsi régulés par le "quorum sensing" [LB2006].

Chez *P. aeruginosa*, les 3 systèmes du "quorum sensing" sont les système *las*, *rhl* et PQS ("Pseudomonas Quinolone Signal") [LB2006].

Le rôle crucial du "quorum sensing" pour la pathogénicité suggère de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient être dirigées contre ce dernier, et seraient une alternative à l'approche actuelle basée sur des antibiotiques. Parmi les différentes voies de blocage possible, les furanones ont montré leur efficacité à bloquer l'expression de nombreux gènes de virulence régulés par le "quorum sensing" chez l'animal [LB2006].

2.4 Infections dues à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est capable d'infecter des hôtes très variés depuis les insectes ou les plantes jusqu'à l'homme, et ceci grâce à un unique arsenal de facteurs de virulence [Rah2000]. Ce pathogène opportuniste, rarement présent chez les individus en bonne santé (ou en très faible quantité), colonise des patients immunodéprimés, notamment des malades atteints du virus du SIDA, des grands brûlés ou des patients traités par chimiothérapies neutropéniantes³ [Lyc2000].

Il infecte également des malades hospitalisés suite à une opération chirurgicale, ou munis de cathéters ou de sondes pendant une longue durée chez qui il peut causer des septicémies, infections urinaires, pneumonies, infections chroniques des poumons, endocardites, dermatites et ostéochondrites [Lyc2000]. Il est le 4^{ème} organisme pathogène le plus couramment rencontré et est à ce titre à l'origine de 10% des maladies nosocomiales qui touchent 5% des patients hospitalisés et causent plus de 4000 décès par an en France (source Institut de Veille Sanitaire, 18 janvier 2007).

Cette bactérie est en particulier responsable d'infections mortelles chez les malades atteints de mucoviscidose dont elle colonise l'épithélium des voies respiratoires [Lyc2000]. La souche de *P. aeruginosa* dont nous disposons (CHA) est par ailleurs une souche clinique, isolée d'un patient des Hôpitaux de Grenoble atteint de mucoviscidose.

2.5 Facteurs de virulence

De nombreux facteurs de virulence sont responsables de la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Ceux-ci peuvent être séparés en 3 groupes :

2.5.1 Facteurs de virulence sur la surface bactérienne

Les facteurs de virulence présents au niveau de la paroi bactérienne sont notamment impliqués dans l'adhérence et la colonisation de son hôte par *P. aeruginosa*.

³Neutropénie : taux bas de granulocytes dans le sang, ce qui est propice à des infections [Bod1966]

Mentionnés auparavant, ce sont principalement les pili de type IV et le flagelle qui ont un rôle dans la mobilité et l'adhérence bactérienne.

Dans le cas de l'organisation en biofilms, la matrice d'exopolysaccharides joue un rôle important dans la pathogénicité en protégeant les bactéries vis à vis du système immunitaire de l'organisme-hôte. Elle peut également stimuler la réponse inflammatoire de l'organisme infecté comme c'est le cas chez les malades atteints de mucoviscidose dont les poumons sont infectés par *P. aeruginosa*, ce qui là encore est favorable à la colonisation bactérienne [Lyc2000].

2.5.2 Facteurs de virulence sécrétés

Les toxines et protéases sécrétées dans le domaine extra-cellulaire provoquent des lésions dans les tissus infectés et favorisent ainsi la dissémination de la bactérie. Les toxines sécrétées par le système de sécrétion de type III (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY), qui ont un rôle prépondérant dans la virulence bactérienne [Kip2006], seront étudiées dans le paragraphe suivant.

La protéase alcaline est sécrétée par le système de sécrétion de type I et cible la fibrine. Son rôle pour la pathogénicité bactérienne a été mis en évidence dans le cadre d'infections de la cornée, mais elle pourrait aussi jouer un rôle dans l'infection des poumons et serait une cible thérapeutique potentielle [Guz1991, Kip2006].

L'élastase LasB est une métalloprotéase sécrétée par le système de sécrétion de type II qui entraîne au niveau des voies respiratoires des lésions dans les jonctions épithéliales. Plus généralement, l'élastase endommage les barrières physiques de l'organisme-hôte. De plus, elle active la réponse inflammatoire et affaiblit celle du système immunitaire, paramètres en faveur de l'infection [Kip2006].

La phospholipase C est, elle aussi, sécrétée par le système de sécrétion de type II. Elle cible des phospholipides contenus dans les membranes des cellules eucaryotes infectées sur lesquelles elle a une action hémolytique. Elle participe ainsi à l'inflammation et à l'infection des poumons [Kip2006].

L'exotoxine A (ExoA) est également sécrétée par le système de sécrétion de type II. Elle inhibe la synthèse de protéines chez les cellules de mammifères en inhibant le facteur d'élongation 2 (EF2), ce qui conduit à la mort de la cellule infectée [Pav1978]. ExoA joue un rôle majeur parmi les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* puisque chez la souris, un mutant délété de *exoA* est 20 fois moins

virulent que la souche sauvage [Miy1995].

2.5.3 Toxines du système de sécrétion de type III

Les toxines sécrétées par le système de sécrétion de type III sont ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. Elles jouent un rôle prépondérant pour la virulence bactérienne [Kip2006]. Parmi ces toxines, ExoT et ExoY jouent un rôle mineur pour la cytotoxicité, ExoS est modérément cytotoxique et ExoU a un rôle majeur ; elle est 100 fois plus cytotoxique qu'ExoS [Kip2006, Lee2005].

ExoS perturbe l'organisation du cytosquelette de la cellule infectée par son activité ADP-ribosyltransférase [Sha2004]. Malgré son rôle pour la cytotoxicité, aucune stratégie thérapeutique n'est dirigée contre cette protéine.

ExoT a un rôle similaire à ExoS mais son rôle mineur pour la cytotoxicité ne fait pas d'elle une cible thérapeutique intéressante [Kip2006].

ExoY induit une augmentation de la perméabilité pulmonaire par son activité adénylate-cyclase [Say2004]. Cependant là encore, sa faible cytotoxicité ne fait pas d'elle une cible thérapeutique intéressante.

ExoU a une activité phospholipase A2 qui endommage les membranes des cellules-cible eucaryotes, après activation par un cofacteur de la cellule infectée. C'est la toxine majeure de *P. aeruginosa*, ce qui fait d'elle une cible thérapeutique très intéressante. En effet, 80% des souris immunisées contre ExoU survivent à une infection par la souche PA103 de *P. aeruginosa* [Kip2006]. Cependant elle n'est pas conservée dans toutes les souches de *P. aeruginosa*, et en particulier pas dans la souche de référence PA01 [Wol2003].

2.6 Traitement des infections par *P. aeruginosa*

2.6.1 Traitements anti-inflammatoires

Afin de réduire l'inflammation des tissus infectés, en particulier des poumons, de nombreux anti-inflammatoires oraux comme le piroxicam ou l'ibuprofène sont couramment utilisés dans les centres de traitement des malades atteints de mucoviscidose [Kon1995].

2.6.2 Traitements antibiotiques

Une autre alternative est l'administration massive de panoplies d'antibiotiques (tobramycine, piperacilline, ceftazidime, aztreonam, thienamycine, meropenem, colistine, ciprofloxacine) à un stade précoce de l'infection. Cette approche est notamment développée dans le centre danois de traitement de la mucoviscidose (Danish Cystic Fibrosis Center) dans le but de restaurer la fonction pulmonaire en répétant 2 semaines de traitement intensif espacés de 3 mois. Grâce à cela, 90% des malades au moins survivent 10 ans après le début de la maladie [Hoi1998].

La ciprofloxacine, de la famille des fluoroquinolones, est couramment administrée par voie orale, et conduit à la destruction de 60 à 90% des bactéries organisées en biofilms, ceci à faible concentration de ciprofloxacine ($5 \mu\text{g/mL}$) après 4 heures de traitement [Pre1996]. Cependant, l'éradication de l'infection par *P. aeruginosa* n'est jamais définitive [Sza1983] et malgré le traitement qui limite la densité bactérienne et l'inflammation, l'infection détruit progressivement les tissus pulmonaires des malades atteints de mucoviscidose [Gol1986].

2.7 Résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa est très résistante aux traitements antimicrobiens classiques [Fri2004].

Ceci est dû d'une part à sa croissance sous forme de biofilms qui entrave le système immunitaire de l'organisme-hôte [Cos1999] et entraîne une croissance bactérienne lente, ce qui affaiblit l'action des antibiotiques [Fil2003]. Les bactéries organisées en biofilms peuvent en effet être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que les cellules planctoniques [Mah2003]. D'autre part, *P. aeruginosa* possède sur son chromosome des gènes de résistance aux antibiotiques, comme *ampC* codant pour une céphalosporinase qui confère à cette bactérie une forte résistance aux β -lactamines, dont les céphalosporines. Elle est également capable d'acquérir des plasmides de résistance [Lis2002]. De plus, la paroi de *P. aeruginosa* est faiblement perméable aux antibiotiques. Enfin, les nombreuses pompes à efflux rejettent les drogues à l'extérieur de la bactérie [Poo2001].

2.8 Conclusions sur *P. aeruginosa*

Ainsi *P. aeruginosa*, bactérie dont l'étude du système de sécrétion de type III est l'objet de cette thèse, est un organisme pathogène opportuniste qui possède un large arsenal de facteurs de virulence. Elle est responsable de nombreuses et très diverses infections chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Elle est de plus extrêmement résistante aux antibiotiques, et pour cela est à l'origine d'infections qui sont souvent difficiles, voire impossibles, à traiter. Pour ces raisons, *P. aeruginosa* représente un problème de santé publique majeur.

Chapitre 3

Les différents systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif

Il existe au moins 6 systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif qui leur permettent d'infecter des cellules-cible mais aussi de coloniser certaines niches environnementales [Gal1999, Rem2004]. *P. aeruginosa*, pour sa virulence et son adaptation environnementale, utilise les systèmes de sécrétion de type I, II, III, IV et VI [Kip2006, Mou2006]. Chacun est dédié à la sécrétion de molécules spécifiques.

Les bactéries à Gram négatif possèdent deux membranes plasmiques (une membrane interne et une membrane externe). Les protéines destinées à être exportées doivent donc franchir la membrane interne, l'espace périplasmique et la membrane externe. Les systèmes de sécrétion de type I, III et IV permettent le franchissement des 3 barrières en une seule étape, alors que les systèmes de sécrétion de type II et V nécessitent le passage des protéines à travers l'espace périplasmique. Le système de sécrétion de type VI n'a pas été suffisamment caractérisé pour pouvoir être classé dans l'une ou l'autre de ces catégories.

3.1 Le système de sécrétion de type I (T1SS)

Chez *P. aeruginosa*, le système de sécrétion de type I est une pompe à efflux qui permet la sécrétion à la fois de petites molécules comme des antibiotiques, et de protéines comme des protéases à travers la double membrane bactérienne [Kor2000, Fou2002]. Ainsi il participe à la fois à la pathogénicité et à la résistance aux drogues. La sécrétion s'effectue en une seule étape, sans utiliser la voie de sécrétion *Sec* [Kor1989]. Les protéines sécrétées possèdent une séquence signal à leur extrémité C-terminale non clivable dont la structure secondaire est peu conservée [Ger2007].

Il comporte trois protéines (figure 3.1) qui ont été étudiées en particulier chez *Escherichia coli*.

TolC chez *E. coli*, dont la structure a été résolue par cristallographie des rayons X [Kor2000], forme un pore dans la membrane externe. Elle est assemblée en un trimère qui comporte un tonneau β transmembranaire de 40 Å de long et un tonneau α de 100 Å de long qui traverse le périplasme (figure 3.1). Ce dernier pourrait adopter une conformation ouverte ou fermée afin de permettre, ou non, le passage de molécules. Au sein du tonneau α les hélices sont disposées en *coiled-coil* et le canal interne du tonneau se rétrécit alors jusqu'à être fermé à l'extrémité proximale.

AcrB est un anti-porteur de protons ancré dans la membrane interne. Il est assemblé en trimère et possède ainsi un domaine périplasmique de 70 Å de long et un domaine membranaire de 50 Å de long. Sa structure a été résolue par cristallographie des rayons X [Mur2002].

MexA fait partie de la famille des adaptateurs. Ces protéines sont très conservées et sont chacune associées à un transporteur à travers la membrane interne. MexA est l'homologue chez *P. aeruginosa* de AcrA chez *E. coli*. La structure de MexA a été résolue par cristallographie des rayons X [Hig2004]. Suite à la prise en charge de la molécule à sécréter par le transporteur, il est proposé que MexA ait un rôle dynamique clé. En effet, il ouvrirait le canal au centre du trimère de TolC en déroulant le *coiled-coil* à son extrémité proximale et cette association transitoire formerait un canal continu à travers le périplasme [Kor2000]. Le canal ainsi ouvert a un diamètre interne d'environ 25 Å; les protéines destinées à être sécrétées peuvent alors le traverser dans un état au moins partiellement déplié. En outre,

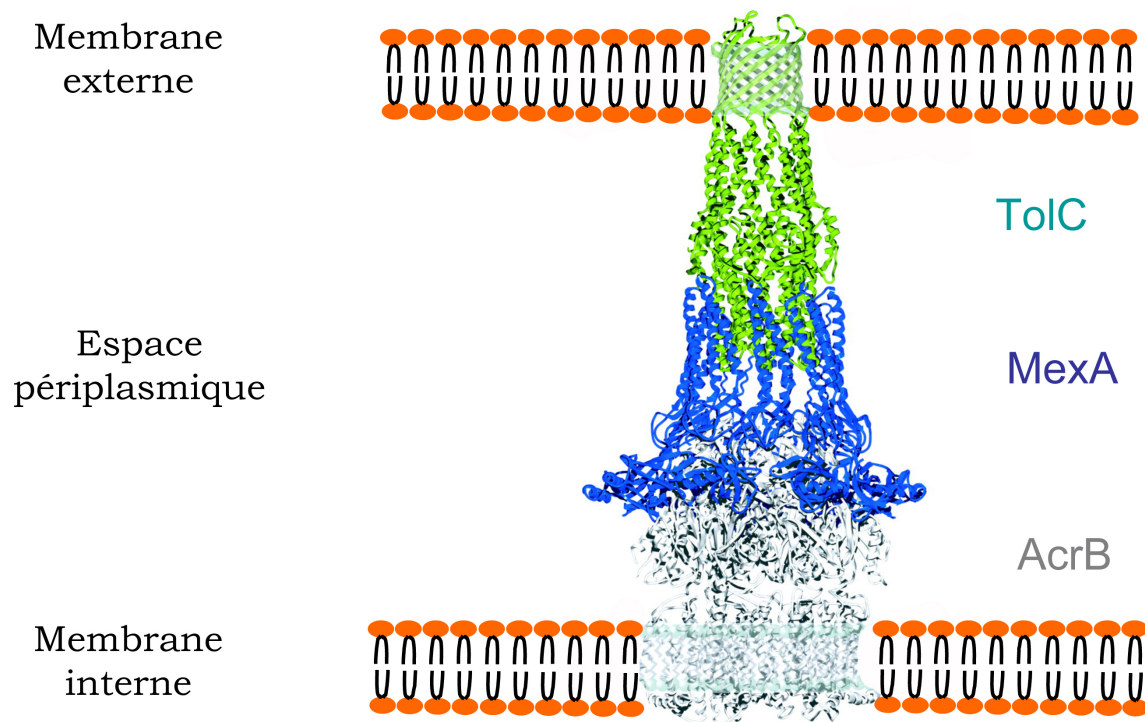


FIG. 3.1 – *Représentation schématique du système de sécrétion de type I. Structures cristallographiques de TolC chez E. coli (en vert, code PDB 1EK9) assemblée en hétérotrimère au niveau de la membrane externe et du périplasm, de la protéine AcrB chez E. coli (en gris, code PDB 1IWG), un anti-porteur de protons ancré dans la membrane interne ainsi que d'une protéine adaptatrice, MexA chez P. aeruginosa (en bleu, code PDB 1T5E).*

l'intérieur du canal de TolC est chargé négativement à son extrémité proximale, ce qui facilite le passage de molécules hydrophobes comme le sont des protéines partiellement dépliées [Kor2000].

3.2 Le système de sécrétion de type II (T2SS)

Le système de sécrétion de type II participe à la virulence et facilite l'adaptation environnementale de nombreux organismes. En effet, il est responsable chez *P. aeruginosa* de la sécrétion des toxines que sont l'élastase, la phospholipase C et l'exotoxine A [Joh2006b, Fou2002].

Les protéines sécrétées sont dotées lors de leur synthèse d'une séquence signal à l'extrémité N-terminale ; séquence d'acides aminés hydrophobes qui permet aux protéines d'être prises en charge par les systèmes de sécrétion *Sec* ou Tat (twin-arginine translocation), selon la nature de leur séquence signal, et ainsi de traverser la membrane bactérienne interne. Le système Tat se distingue du système *Sec* par sa capacité à transporter des enzymes repliées [Vou2001].

Après le clivage du peptide signal par une peptidase dans le périplasme, ces protéines sont transportées dans un état replié à travers la membrane externe de la bactérie.

Le système de sécrétion de type II possède 3 composants structuraux principaux [Joh2006b] (figure 3.2) :

- Le complexe protéique de la machinerie *Sec* ou Tat situé au niveau de la membrane interne, auquel est notamment associé une ATPase qui serait assemblée en hexamère.
- Un pseudo-pilus de type II supposé traverser l'espace périplasmique.

La structure de la protéine tronquée, monomérique, (PulG chez *Klebsiella oxytoca*) a été résolue [Köh2004] et révèle une hélice α qui pourrait jouer dans la polymérisation du pseudo-pilus un rôle similaire à celui de l'hélice α N-terminale du pilus de type IV (chapitre 3.4). En cela, le pseudo-pilus de type II pourrait présenter des analogies d'assemblage avec le pilus de type IV [Pea2003]. Un modèle de l'assemblage du pseudo-pilus a en outre été obtenu par microscopie électronique et révèle la polymérisation en une hélice gauche de PulG [Köh2004].

- Un pore formé d'un dodécamère d'une protéine de la famille des sécrétines,

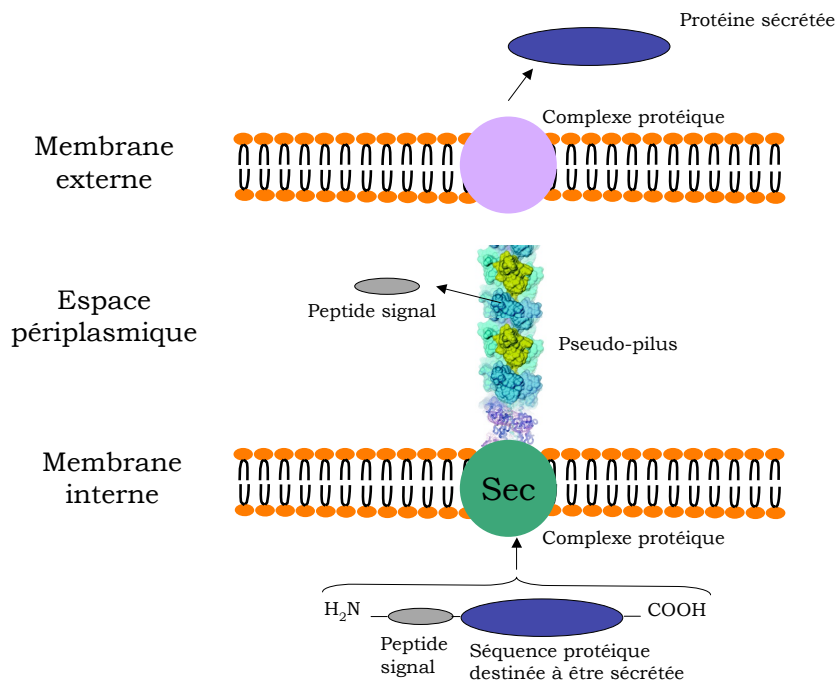


FIG. 3.2 – *Représentation schématique du système de sécrétion de type II.* Le modèle du pseudo-pilus est celui établi à partir de la structure cristallographique de la forme monomérique de PulG tronquée en N-terminal (code PBD 1T92) et d'une carte de densité obtenue par microscopie électronique [Köh2004].

PulD chez *K. oxytoca*, dont un modèle tridimensionnel a été reconstruit par cryo-microscopie électronique [Cha2005].

Il est constitué de 2 anneaux face à face. Son diamètre interne mesure entre 50 et 100 Å et il pourrait s'ouvrir ou se fermer sélectivement afin d'autoriser ou non la sécrétion des toxines dans un état replié. Les parties N-terminale et C-terminale de PulD pourraient s'organiser en 2 domaines fonctionnels distincts. Le domaine C-terminal, conservé chez d'autres bactéries, contiendrait des feuilletts β amphiphiles nécessaires à l'insertion dans la membrane externe alors que le domaine N-terminal, moins conservé et plus flexible, serait impliqué dans des interactions avec d'autres protéines du T2S [Cha2005]. Les mécanismes impliqués dans l'ouverture et la fermeture du pore et dans l'énergisation du transport des protéines à travers la membrane externe sont cependant inconnus.

3.3 Le système de sécrétion de type III (T3SS)

Le système de sécrétion de type III est présent chez plus de 25 bactéries à Gram négatif et leur permet d'interagir avec des cellules-cible, que ce soit dans un but d'infection ou de symbiose [Gal1999]. Il permet à *P. aeruginosa* d'injecter des toxines dépourvues de peptide signal directement du cytoplasme bactérien vers la cellule-cible où elles peuvent causer de graves dommages [Gal1996]. En effet, les protéines bactériennes sécrétées vont interagir avec les protéines de la cellule-cible (protéines G, tyrosines kinases par exemple), ce qui perturbe notamment l'organisation du cytosquelette d'actine et peut conduire à la phagocytose de la bactérie (probablement par IpaA chez *Shigella* spp.), l'inhibition de la phagocytose (par YopH et YopE chez *Yersinia* spp. et ExoS chez *P. aeruginosa*) ou encore l'apoptose de la cellule infectée (par IpaB chez *Shigella* spp.) [Gal1996, Gal1999].

Chez *P. aeruginosa*, le système de sécrétion de type III est induit par 2 voies de signalisation différentes [Das2006] :

- *In vivo*, le contact entre la bactérie pathogène et la cellule infectée active la transcription des gènes qui codent pour les protéines du système de sécrétion de type III [Ros1994, Das2006].
- A 37 °C, le système de sécrétion de type III est également induit par déplétion en calcium dans le milieu. En effet la présence d'ions Ca^{2+} à une concentra-

tion de l'ordre du mM joue un rôle de répresseur de la transcription des gènes codant pour les Yops (" *Yersinia outer proteins*"), des protéines de virulence chez *Y. pestis* [Mic1990, Das2006]. En cas de déplétion en calcium, leur transcription est activée et la sécrétion massive des Yops est alors observée.

L'injectisome de type III est constitué de deux anneaux ancrés dans la double membrane de la bactérie reliés par une tige, d'une aiguille de sécrétion qui pointe vers l'extérieur de la bactérie et au travers de laquelle les toxines sont transloquées et d'un pore de translocation ancré dans la membrane de la cellule infectée (figure 3.3). Il comporte plus de 25 protéines différentes [Kub1998]. Dû à l'étroitesse du canal au centre de l'aiguille qui mesure environ 20-30 Å [Blo2001], il est supposé que les toxines doivent être transportées dans un état partiellement déplié [Cor2000].

Les connaissances structurales concernant le T3SS ont été acquises postérieurement à celles concernant le pilus de type IV ou le flagelle bactérien, ce qui explique que peu de données structurales sur les protéines impliquées dans ce système complexe étaient connues au début de cette thèse.

Le travail réalisé au cours de cette thèse concerne ce système de sécrétion ; celui-ci sera étudié plus précisément dans le chapitre suivant.

3.4 Le système de sécrétion de type IV (T4SS)

Le T4SS est présent chez toutes les bactéries à Gram négatif. Il est impliqué dans des phénomènes aussi variés que la sécrétion de complexes nucléoprotéiques, la sécrétion de toxines, la transformation d'ADN, l'adhésion, la mobilité bactérienne ou la réponse au système immunitaire [Din2003, Cra2004]. Il a un rôle important dans l'élaboration du biofilm et la pathogénicité de la bactérie [Fil2003]. Sa fonctionnalité repose sur la capacité de croissance et de rétraction rapide du pilus [Mer2000].

Le T4SS est constitué d'une base ancrée dans la double membrane bactérienne et d'un pilus, formé d'un homopolymère de piline [Cra2004] (figure 3.4). A sa base et dans le domaine cytoplasmique, 2 ATPases permettent la croissance et la rétraction du pilus [Fou2002].

Son architecture et son assemblage seront exposés ultérieurement (chapitre 3.4).

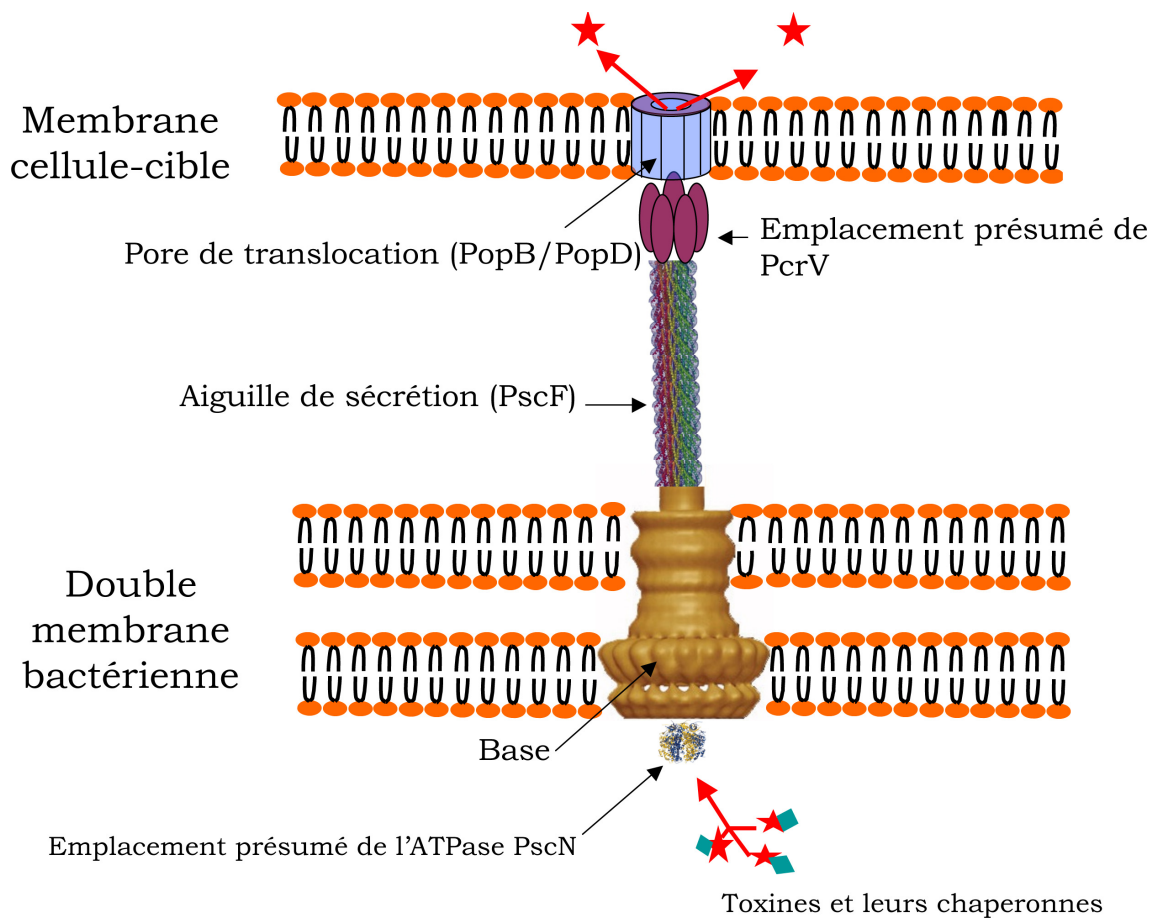


FIG. 3.3 – *Représentation schématique présumée du système de sécrétion de type III chez P. aeruginosa.* Les noms de protéines indiqués correspondent aux protéines de *P. aeruginosa*. L'ATPase représentée est le modèle hexamérique de l'ATPase *FliI* chez le flagelle bactérien, construit dans le laboratoire de NAMBA à partir de la structure cristallographique du monomère [Ima2007]. La base est celle reconstruite par cryo-microscopie électronique dans le laboratoire de GALAN chez *S. typhimurium* [Mar2006]. L'aiguille correspond au modèle établi dans les laboratoires de LEA et BLOCKER chez *S. flexneri* [Dea2006] à partir de la structure cristallographique du monomère de *MxiH* tronqué (code PDB 2CA5) et d'une carte de densité par microscopie électronique de l'aiguille de sécrétion. Enfin *PcrV* est placé tel que son orthologue *LcrV* a été observé dans le laboratoire de CORNELIS chez *Y. pestis* [Mue2005]

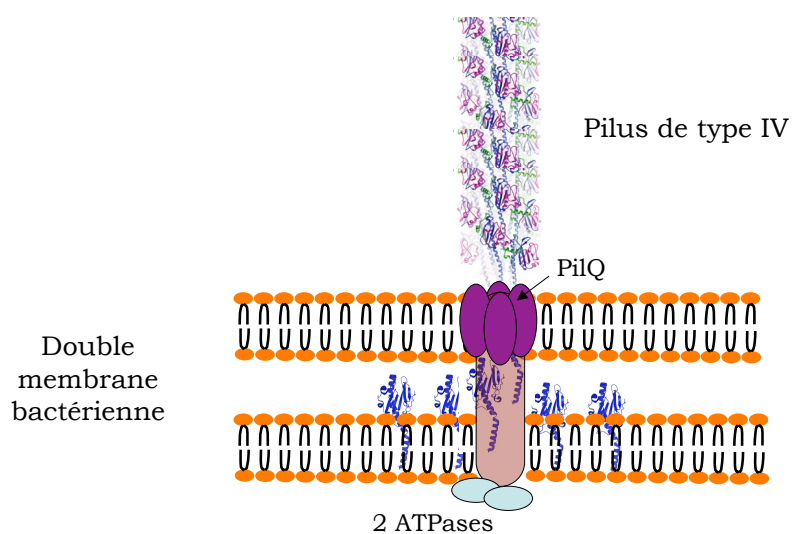


FIG. 3.4 – *Représentation schématique du système de sécrétion de type IV.* L'assemblage des molécules de piline est celui observé par microscopie électronique dans le laboratoire de TAINER [Cra2003] (code EM-1236, code PDB 1OR9).

3.5 Le système de sécrétion de type V (T5SS), famille des autotransporteurs

Nous décrirons brièvement dans cette section le cas particulier des protéines auto-transportrices. Ce système de sécrétion est particulièrement simple puisqu'il ne requiert pas de machinerie de sécrétion spécifique. Il permet la sécrétion de ce type de protéines.

Les protéines auto-transportrices possèdent 4 domaines principaux distincts (du N-terminal vers le C-terminal) (figure 3.5) [Hen2004].

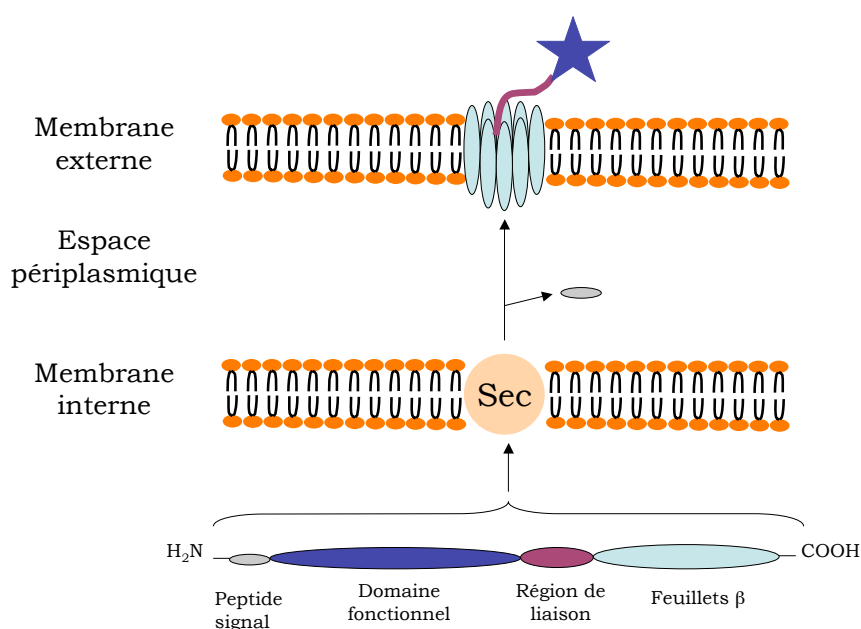


FIG. 3.5 – *Représentation schématique du système de sécrétion de type V correspondant aux autotransporteurs. Adapté de HENDERSON [Hen2004].*

Les protéines auto-transportrices sont synthétisées dans le cytoplasme bactérien et exportées à travers la membrane interne par la voie de signalisation *Sec*, où le peptide signal est coupé. Le domaine replié en feuillets β s'insère alors dans la

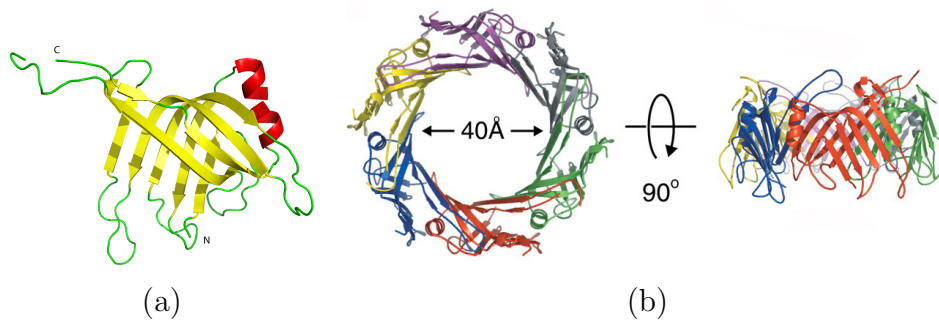


FIG. 3.6 – **La protéine Hcp1.** (a) Structure cristallographique du monomère de Hcp1 et (b) son assemblage en anneau hexamérique (code PDB 1Y12) (d'après MOUGOUS et al., 2006) [Mou2006].

membrane externe en un tonneau β au travers duquel la région fonctionnelle repliée est ensuite transportée.

3.6 Le système de sécrétion de type VI (T6SS)

En 2006, un nouveau système de sécrétion nommé système de sécrétion de type VI a été découvert chez *P. aeruginosa* [Mou2006]. Il permet la sécrétion de protéines dépourvues de peptide signal. Chez *P. aeruginosa*, ce système, codé par le locus IAHP¹, est régulé par 2 protéines RetS et LadS et la protéine ClpV1 fournit l'énergie nécessaire. Ce système sécrète abondamment une protéine d'environ 18 kDa identifiée comme Hcp1 chez les patients atteints de mucoviscidose qui sont infectés de façon chronique par *P. aeruginosa*, ce qui suggère un rôle important joué par ce système de sécrétion lors de l'infection chronique par *P. aeruginosa*.

La structure de Hcp1 montre que la molécule s'organise en hexamères en solution dans des conditions physiologiques et chaque monomère a un repliement en 1 hélice α et 10 brins β [Mou2006] (figure 3.6-a). L'hexamère assemblé a un diamètre interne d'environ 40 Å. Hcp1 formerait ainsi un tonneau à 24 brins β au travers duquel d'autres macro-molécules pourraient être transportées (figure 3.6-b).

L'implication de ce système de sécrétion dans l'infection par *P. aeruginosa* de

¹IAHP : "IcmF Associated Homologous Protein". Cluster de gènes présent chez 9 espèces de bactéries à Gram négatif.

malades atteints de mucoviscidose confère un enjeu thérapeutique à l'étude de ce système [Mou2006]. De plus, la conservation de ce locus de gène chez de nombreux pathogènes protéobactériens à Gram négatif suggère un rôle important joué par ce nouveau système de sécrétion dans le cadre de l'interaction hôte-pathogène.

3.7 Conclusions sur les différents systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif

Différents systèmes de sécrétion plus ou moins complexes peuvent coexister au sein d'une même bactérie à Gram négatif et permettent d'exporter des macromolécules à travers la double membrane bactérienne. Parmi eux, les systèmes de sécrétion de type III et IV sont particulièrement élaborés, constitués d'une base ancrée dans la double membrane et d'une structure qui pointe vers l'extérieur de la bactérie et permet la sécrétion de substrats au contact et à l'intérieur de la cellule hôte respectivement.

Chapitre 4

Connaissances structurales et fonctionnelles sur le système de sécrétion de type III (T3SS)

Les protéines étudiées dans le cadre de cette thèse appartiennent au T3SS dont nous exposerons de façon plus détaillée dans ce chapitre les caractéristiques en terme d'évolution ainsi que les connaissances structurales et fonctionnelles acquises sur ce système.

4.1 Origine

Des études mettent en évidence des similitudes architecturales importantes entre le T3SS et le flagelle bactérien, qui peuvent s'expliquer par une origine commune (figure 4.1) [Aiz1996, VG1995, Gal1999, Yip2006]. En particulier, des études génétiques ont mis en évidence que les séquences de 8 protéines structurales de la base du système de sécrétion de type III sont très semblables à celles des protéines de la base du flagelle bactérien [VG1995]. De plus, l'observation par microscopie électronique de la base du T3SS chez *Salmonella typhi* dans le laboratoire de AIZAWA a révélé que celle-ci ressemble à la base du flagelle, de part sa taille et son organisation en 2 anneaux [Kub1998, Aiz2001]. Pour cette raison, la structure du flagelle bactérien sera étudiée dans un chapitre ultérieur.

D'après des études génétiques, le T3SS ne dériverait pas du flagelle bactérien.

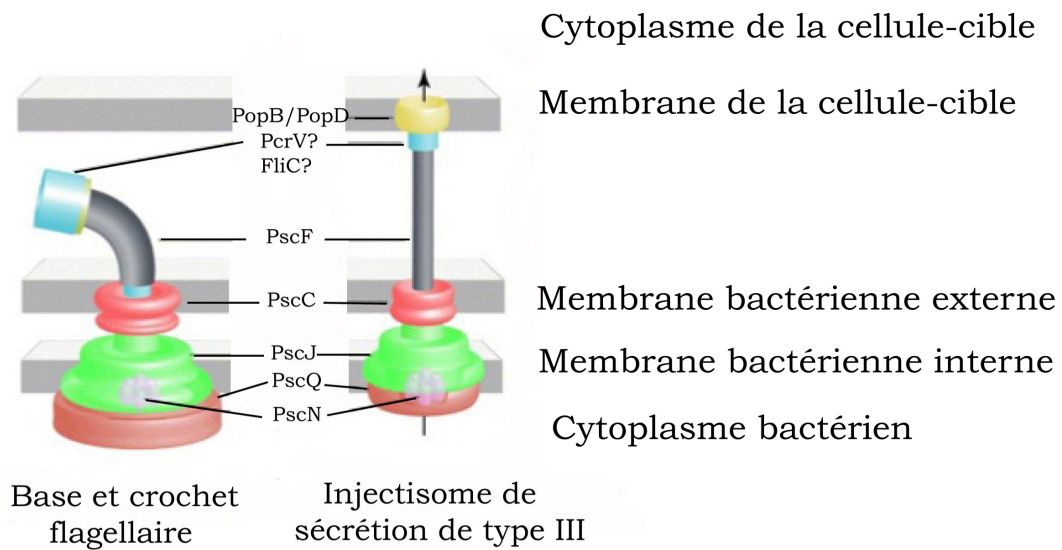


FIG. 4.1 – **Représentation schématique du flagelle bactérien et du système de sécrétion de type III.** Ces deux structures possèdent une architecture similaire, composée d'une base formée de 2 anneaux ancrés dans la membrane interne (vert et marron) et externe de la bactérie (rouge), d'une ATPase (rose) et d'une structure creuse hélicoïdale (gris) qui pointe à l'extérieur de la bactérie. Afin d'injecter des protéines dans les cellules-cibles, l'aiguille de sécrétion de type III est dotée d'une "plate-forme" protéique (bleu) et d'un pore de translocation dans la membrane de la cellule infectée (jaune). Les noms de protéines indiqués correspondent à celles du système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. *FliC* est la protéine qui forme le filament flagellaire (d'après YIP et al., 2006 [Yip2006]).

Ces 2 systèmes seraient en effet aussi anciens, et dériveraient probablement d'un ancêtre commun [Gop2003].

4.2 Variabilité et conservation

Le système de sécrétion de type III est présent chez plus de 25 bactéries à Gram négatif parmi les plus virulentes, comme *Y. pestis* responsable de la peste ou *S. typhimurium*, agent causatif de la fièvre typhoïde [Cor1997, Gal1999, Cor2000]. Il concerne en outre une large gamme de bactéries pathogènes dont les cibles s'étendent des mammifères jusqu'aux insectes et aux plantes [Gal1999].

Chaque organisme sécrète jusqu'à 6 ou 7 toxines qui lui sont propres, ce qui conduit à plus de 100 toxines spécifiques sécrétées par les T3SS des différentes bactéries [Cor2006]. Les protéines structurales de l'injectisome de sécrétion sont en revanche bien conservées, avec des homologies de séquence importantes (de l'ordre de 25% d'identité entre protéines orthologues). La table 4.1 (p. 52) regroupe les protéines orthologues des systèmes de sécrétion de type III chez les différentes bactéries de référence.

On peut diviser ce système de sécrétion en 7 sous-familles [Gop2003]. Les arbres phylogénétiques des injectisomes de type III et des bactéries qui en sont dotées ne sont pas corrélés, ce qui suggère que la distribution des gènes codant pour ce système de sécrétion s'est produite horizontalement parmi les bactéries, et tard dans leur évolution suite à des transferts génétiques latéraux.

On distingue ainsi [Tro2005, Cor2006] :

1. la famille Ysc (*Yersinia spp.*, *P. aeruginosa*, *Photobacterium luminescens*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella spp.* et *Desulfovibrio vulgaris*),
2. la famille Inv-Mxi-Spa (*Salmonella enterica*, *Shigella spp.*),
3. la famille Ssa-Esc (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*), où l'aiguille de sécrétion est prolongée par un long filament flexible qui permet à la bactérie d'atteindre les cellules des muqueuses digestives en traversant le mucus intestinal,
4. la famille Hrc-Hrp (*Pseudomonas syringae*, pathogène de plantes), où l'injectisome se présente sous la forme d'un pilus long et flexible qui peut ainsi traverser les parois cellulaires épaisses des plantes,
5. la famille des rhizobiées,
6. la famille des chlamydiées.

4.3 Description de l'injectisome

L'injectisome de sécrétion est une véritable nanomachine, un système complexe constitué de plus de 25 protéines différentes, dont près de la moitié sont conservées chez tous les systèmes connus [Tam2004]. Il a d'abord été caractérisé chez *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* dans les laboratoires de AIZAWA et GALAN en

TAB. 4.1 – Protéines orthologues dans les systèmes de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*, *Y. pestis*, *E. coli*, *S. typhimurium* et *S. flexneri*. Les chaperonnes qui leur sont associées sont indiquées entre parenthèses.

	FAMILLE YSC		FAMILLE SSA-ESC	FAMILLE INV-MXI-SPA	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. flexneri</i>
BASE					
ATPase	PscN	YscN	EscN	InvC/SpaL	Spa47
Protrusion périplasmique	PscQ	YscQ	EscQ	InvK/SpaO	Spa33
Anneau (membrane interne)	PscR	YscR	EscR	InvL/SpaP	Spa24
Anneau (membrane interne)	PscS	YscS	EscS	SpaQ	Spa9
Anneau (membrane interne)	PscT	YscT	EscT	InvN/SpaR	Spa29
Anneau (membrane interne)	PscU	YscU	EscU	SpaS	Spa40
Anneau (membrane interne)	PscV	YscV	EscV	InvA	MxiA
Lipoprotéine (périplasme)	PscJ	YscJ	EscJ	PrgK	MxiJ
Anneau (membrane externe)	PscC	YscC	EscC	InvG	MxiD
AIGUILLE	PscF (PscE PscG)	YscF (YscE YscG)	EscF	PrgI	MxiH
RÈGLE MOLÉCULAIRE	PscP	YscP		InvJ	Spa32
PROTÉINES TRANSLOCATRICES	PopB/PopD (PcrH) PcrV (PcrG)	YopB/YopD (LcrH) LcrV (LcrG)	EspB/EspD EspA (CesA)	SipB/SipD SipD	IpaB/IpaC (IpgC) IpaD

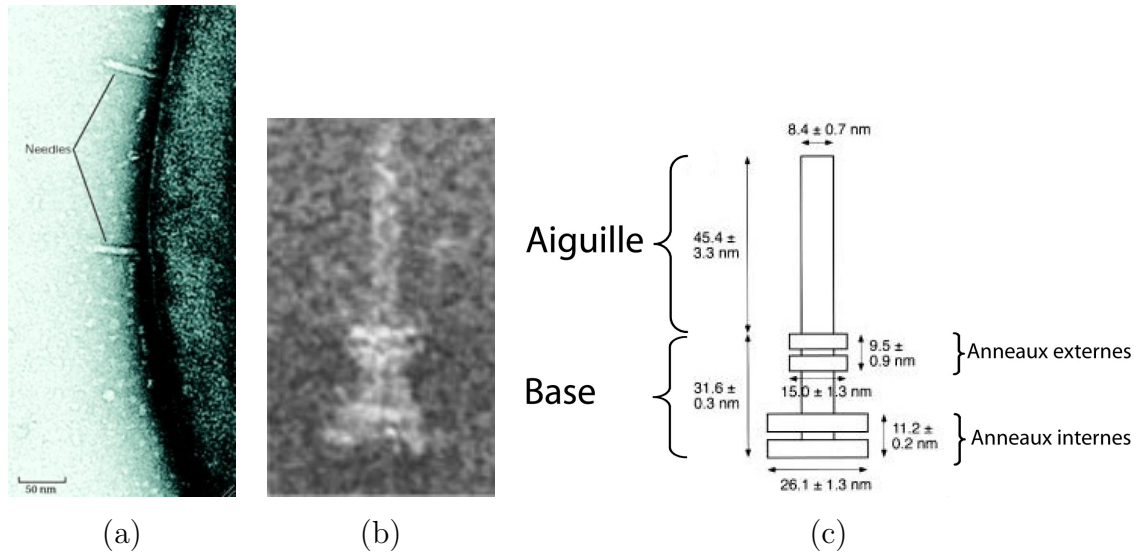


FIG. 4.2 – **Visualisation du sécréton.** (a) Aiguilles de sécrétion de type III à la surface de *Y. pestis* (d'après TROISFONTAINES et al., 2005). (b) Sécréton isolé purifié à partir de *S. flexneri* observé par microscopie électronique à coloration négative. On distingue l'aiguille et les anneaux qui forment la base. (c) Schéma du sécréton chez *S. flexneri* dressé à partir des observations par microscopie électronique (d'après TAMANO [Tam2000]).

1998 [Kub1998]. Il est composé de 2 parties principales : le sécréton constitué de la base et de l'aiguille de sécrétion (figure 4.2) et le translocon. La base est ancrée dans la double membrane bactérienne. Afin de permettre l'injection de toxines dans la cellule infectée, la bactérie transloque au préalable des protéines qui s'insèrent dans la membrane de la cellule-cible où elles forment un pore de translocation, ou translocon [Ney1999, Blo1999].

4.3.1 La base

Description

La base de l'injectisome est constituée de 2 anneaux ancrés dans la double membrane bactérienne reliés par une tige creuse qui traverse le périplasme. Un modèle de sa structure tridimensionnelle a été construit par cryomicroscopie électronique à une résolution de 17 Å [Mar2004]. Elle mesure environ 300 Å de haut et 240 Å de

large. Elle révèle également une symétrie rotationnelle moyenne d'ordre 20 pour les systèmes d'anneaux ancrés dans les membranes, avec une légère variabilité (ordre 19 à 21) que l'on retrouve également chez le flagelle (symétrie d'ordre 24-27, en général 26, chez FliF), et qui pourrait provenir d'inhomogénéités dues à la préparation [You2003, Tho2006].

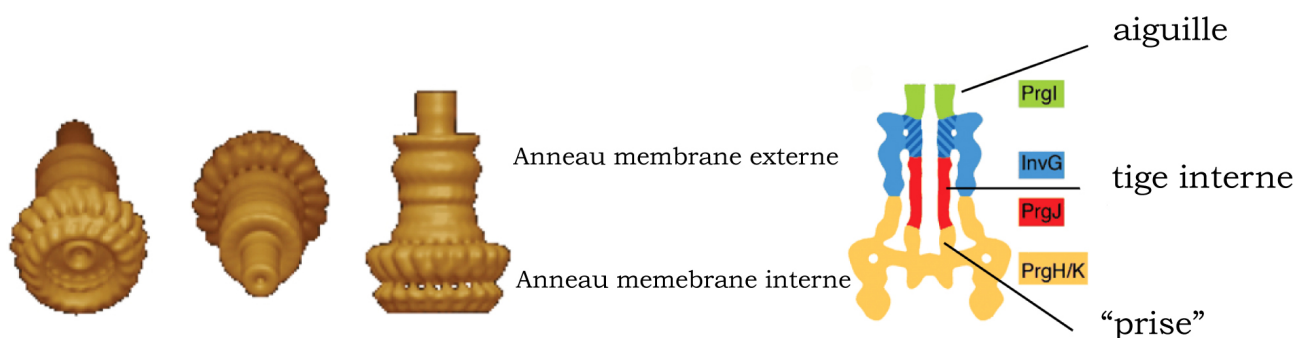


FIG. 4.3 – *Modèle par cryomicroscopie électronique de la base de l'injectosome de type III de S. typhimurium.* (a) A une résolution de 17 Å, il est possible de distinguer les molécules des oligomères qui forment les anneaux ancrés dans la double membrane. (b) Schéma représentant la localisation supposée de 5 constituants principaux de la base chez *S. typhimurium*. La zone hachurée correspond à la frontière incertaine entre PrgI, PrgJ et InvG (d'après MARLOVITS [Mar2004]).

Chez *S. typhimurium*, l'anneau ancré dans la membrane externe est composé de InvG, membre de la famille des sécrétines [Kub2000]. Des anneaux de InvG d'environ 150 Å de diamètre externe ont été observés par microscopie électronique dans le laboratoire de KORONAKIS [Cra1998]. Des structures annulaires ont également été observées pour la sécrétine YscC chez *Y. pestis* [Kos1997]. Les sécrétines sont aussi présentes dans le T2SS et le T4SS [Cha2005]. Ces protéines sont capables de s'insérer dans la membrane bactérienne externe et une lipoprotéine (InvH chez *S. typhimurium*) permet la localisation de InvG au niveau de cette membrane [Dae1998]. Les mécanismes impliqués dans l'insertion des sécrétines dans la membrane externe sont cependant inconnus à ce jour.

L'anneau ancré dans la membrane interne est, lui, chez *S. typhimurium*, constitué des lipoprotéines PrgH et PrgK. Tout comme InvG, elles sont dotées d'un peptide signal qui leur permet d'être prises en charge par la machinerie de sécrétion *Sec* [Kub2000]. Après son exportation, le peptide signal de PrgH n'est pas clivé, ce qui

est cohérent avec le fait que cette protéine reste associée à la membrane interne en faisant partie de l'anneau interne de la base [Kub1998]. Bien que l'architecture générale de la base de l'injectisome de type III ressemble à celle de la base du flagelle [Aiz1996], InvG et PrgH ont peu d'homologies de séquence avec les protéines qui forment la base du flagelle [Kub1998]. PrgK, cependant, partage des similarités de séquence avec la protéine FliF qui constitue l'anneau interne du flagelle [Suz1998].

Contrairement à PrgH, qui n'est pas conservée chez les autres injectisomes de type III, PrgK est très conservée. Elle est l'homologue de EscJ chez *E. coli* (famille de YscJ chez *Y. pestis*), dont la structure tridimensionnelle a été résolue par cristallographie aux rayons X à une résolution de 1,8 Å dans le laboratoire de STRYNADKA [Yip2005b] (code PDB 1YJ7). Contrairement à d'autres membres de sa famille, dont PrgK, EscJ est dépourvue de l'hélice transmembranaire C-terminale ce qui amène les auteurs à proposer qu'au lieu de former un pore dans la membrane bactérienne interne, EscJ se positionne au dessus de celle-ci où elle joue le rôle de plateforme pour l'assemblage de la base.

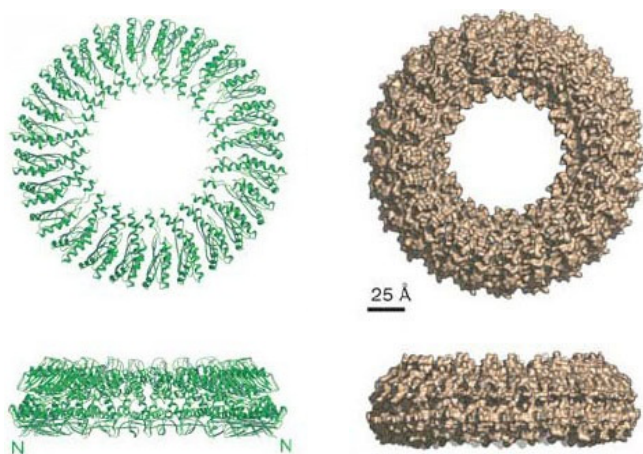


FIG. 4.4 – **Modélisation de l'assemblage en anneau de 24 sous-unités de EscJ.** Ce modèle a été obtenu *in silico* d'après la structure cristallographique du monomère (code PDB 1YJ7). Cet anneau correspondrait à celui associé à la membrane interne de la bactérie (D'après YIP et al., 2006 [Yip2005b]).

D'après une modélisation moléculaire faite par les auteurs ainsi que d'après l'organisation de la maille cristalline, EscJ pourrait s'assembler en un anneau de

24 sous-unités (figure 4.4) de 170 Å de diamètre externe et de 52 Å de haut. La stœchiométrie du complexe est en accord avec des observations de microscopie électronique et de spectrométrie de masse après biotinylation limitée des lysines. D'après la modélisation moléculaire, son diamètre externe se rétrécit de 120 Å environ au niveau de la face interne de la membrane interne à 73 Å environ du côté du périplasme. Cette morphologie est similaire à celle observée par microscopie électronique dans le laboratoire de NAMBA à une résolution de 22 Å pour l'anneau interne formé par la protéine FliF chez le flagelle [Suz2004].

L'association à la membrane se ferait par les extrémités N-terminales des molécules de EscJ puisque celles-ci sont exposées au niveau de la face la plus large de l'anneau, qui serait en contact avec la membrane interne alors que la face la plus étroite serait exposée vers le périplasme.

PrgJ chez *S. typhimurium* formerait la tige qui traverse le périplasme pour relier les deux anneaux membranaires [Suk2001].

Modèle d'assemblage

Un modèle de l'assemblage de l'injectisome de type III a été proposé dans le laboratoire de GALAN [Kub2000, Suk2001]. Selon les auteurs, la première étape consiste en l'assemblage de la base. Les protéines PrgH, PrgK et InvJ chez *S. typhimurium* seraient tout d'abord exportées à travers la membrane interne par la voie de sécrétion *Sec*, avant de s'assembler pour former la base de l'injectisome. Les sécrétines InvG seules seraient capables de s'assembler en anneau, cependant l'efficacité d'oligomérisation est accrue en présence de PrgH et PrgK [Cra1998, Dae1998]. Ainsi les trois protéines se co-stabiliseraient afin de former une structure stable. La protéine auxiliaire InvH, absente de la base de l'injectisome n'est pas essentielle à l'assemblage. Elle participerait néanmoins elle aussi à la formation de la base, par exemple en facilitant l'oligomérisation de InvG. Aucune autre molécule de virulence ne pourrait être sécrétée avant que la base soit complètement assemblée [Col1996].

4.3.2 L'ATPase

L'ATPase joue un rôle clé puisqu'elle fournit l'énergie nécessaire à l'assemblage de l'injectisome de sécrétion de type III ainsi qu'à la sécrétion des toxines. Elle in-

tervient également dans la dissociation des protéines structurales et des toxines du T3SS de leurs chaperonnes respectives avant l'exportation des premières [Ake2005].

L'ATPase oligomériser en un hexamère et s'associe ainsi à la membrane interne de la bactérie en se positionnant à la base de l'injectisome [Poz2003]. Il est suggéré que 2 hexamères s'associent pour former un dodécamère, dont un modèle a été proposé dans le laboratoire de ECONOMOU et STRAHLBERG [Mul2006]. Son activité d'hydrolyse de l'ATP serait stimulée modérément par son hexamérisation et fortement par sa dodécamérisation [Ake2004, Poz2003].

Cette protéine jouerait le rôle d'un pore qui pourrait s'ouvrir ou se fermer, autorisant ou non le passage de protéines vers l'injectisome de sécrétion [Mul2006].

Un modèle à une résolution de 16 Å de HrcN₁₂, l'ATPase de *P. syringae*, a été proposé en utilisant les données de cryomicroscopie électronique [Mul2006].

Description fonctionnelle d'une ATPase

D'après la structure de la sous-unité β de la F1-ATPase, AKEDA et GALAN ont proposé un modèle de l'ATPase InvC de *S. typhimurium* et défini, sur la base d'études par mutagenèse dirigée, trois domaines fonctionnels distincts [Ake2005] :

1. En partie N-terminale (les 120 premiers résidus environ) : un domaine d'association avec les membranes, également responsable de l'oligomérisation ;
2. Au centre : un domaine catalytique qui lie l'ATP ;
3. En partie C-terminale : un domaine d'association avec les chaperonnes.

Un modèle du processus de décrochement des chaperonnes de leur partenaires ainsi que de la sécrétion des partenaires a également été proposé selon un mécanisme en 3 étapes (figure 4.5) :

1. liaison du complexe chaperonne:effecteur à l'ATPase,
2. décrochage et libération de la chaperonne,
3. suite du dépliement et sécrétion de l'effecteur.

Structure de la forme monomérique tronquée de l'ATPase chez *E. coli*

La structure d'une forme monomérique de EscN, l'ATPase du système de sécrétion de type III chez *E. coli*, a été déterminée à une résolution de 1.8 Å dans

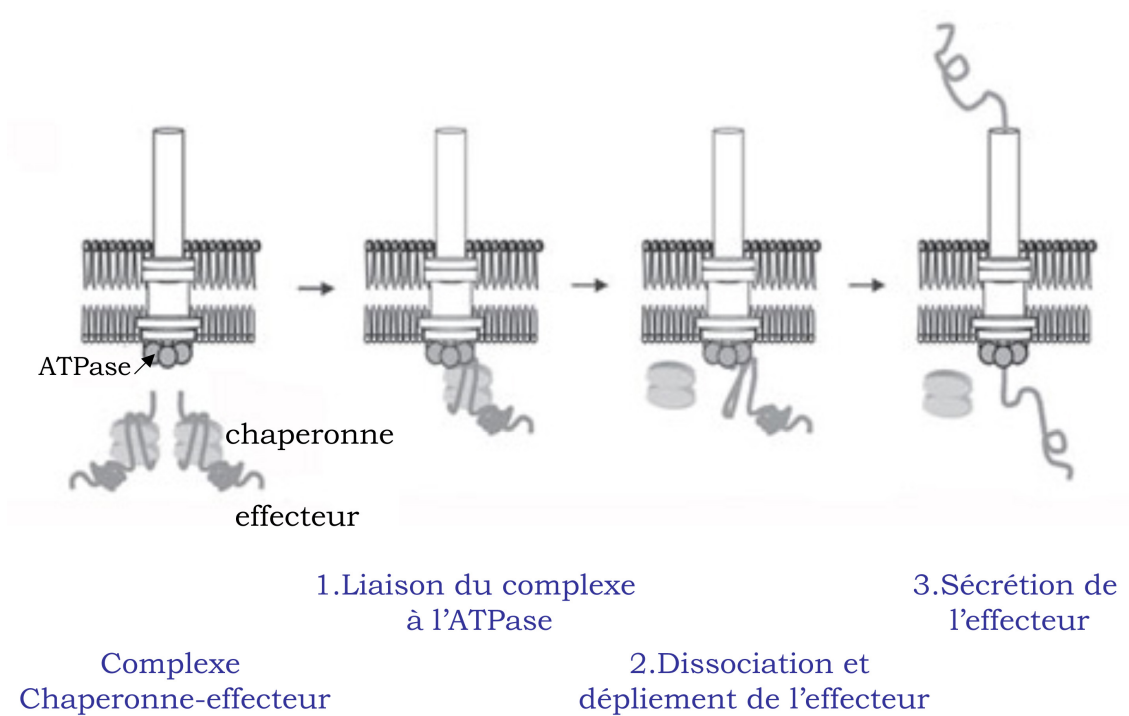


FIG. 4.5 – *Modèle de dissociation par l'ATPase des complexes protéiques chaperonne:effecteur qui précède la sécrétion de l'effecteur* (D'après AKEDA et GALAN, 2005 [Ake2005]).

le laboratoire de STRYNADKA [Zar2007] en tronquant les 102 premiers résidus à l'extrémité N-terminale qui correspondent au domaine responsable de l'oligomérisation de EscN et en mutant la valine 393 en proline.

La structure révèle 2 domaines fonctionnels distincts, l'un à l'extrémité N-terminale de la protéine tronquée correspondant au domaine catalytique qui lie l'ATP et l'autre à l'extrémité C-terminale correspondant au domaine auquel se lient les chaperonnes du système de sécrétion de type III, complexées à l'effecteur qui leur est associé (figure 4.6-a).

Le domaine catalytique a un repliement de Rossmann α/β caractéristique d'une ATPase composé de 9 brins β parallèles entourés de 7 hélices α [Wal1982]. Le site de liaison à l'ATP se situe au niveau de la boucle comprise entre les résidus 179 et 185. Par ailleurs, ce domaine se superpose très bien avec les domaines catalytiques des F1-ATPases avec lesquels les valeurs de déviation moyenne sont comprises entre 2.3 et 1.7 Å pour 228 carbones α pris en compte.

Le domaine de fixation des chaperonnes est constitué de 5 hélices α . Il est beaucoup moins conservé que le domaine catalytique et cela serait à l'origine de la spécificité de l'ATPase du système de sécrétion de type III pour les substrats correspondants. A l'intérieur de ce domaine, la valine 393 est impliquée dans la liaison aux chaperonnes puisque la mutation de ce résidu en proline affecte la liaison aux chaperonnes, sans perturber l'activité d'hydrolyse de l'ATP ni l'oligomérisation de EscN.

La structure de FliI(Δ 1-18), l'ATPase chez le flagelle, a été résolue dans le laboratoire de NAMBA à une résolution de 2,4 Å (figure 4.6-b, code PDB 2DPY). En plus de la partie correspondante à la structure tronquée de EscN, on peut y voir un tonneau β constitué de 6 brins β , lié au reste de la protéine par une région flexible non visible sur la carte de densité électronique. Ce tonneau β fait partie de la partie N-terminale de l'ATPase proposée comme étant impliquée dans l'association aux membranes et l'oligomérisation de la protéine. Un modèle hexamérique a également été proposé par les auteurs à partir de la structure de la F₁-ATPase dans lequel les régions N-terminales pointent vers l'extérieur de l'hexamère (figure 4.6-d).

Un modèle de l'anneau hexamérique de EscN a été construit *in silico* par les auteurs. Il mesure environ 70 Å de haut et a un diamètre externe d'environ 105 Å et un diamètre interne d'environ 50 Å. Conformément à ce qui est observé chez

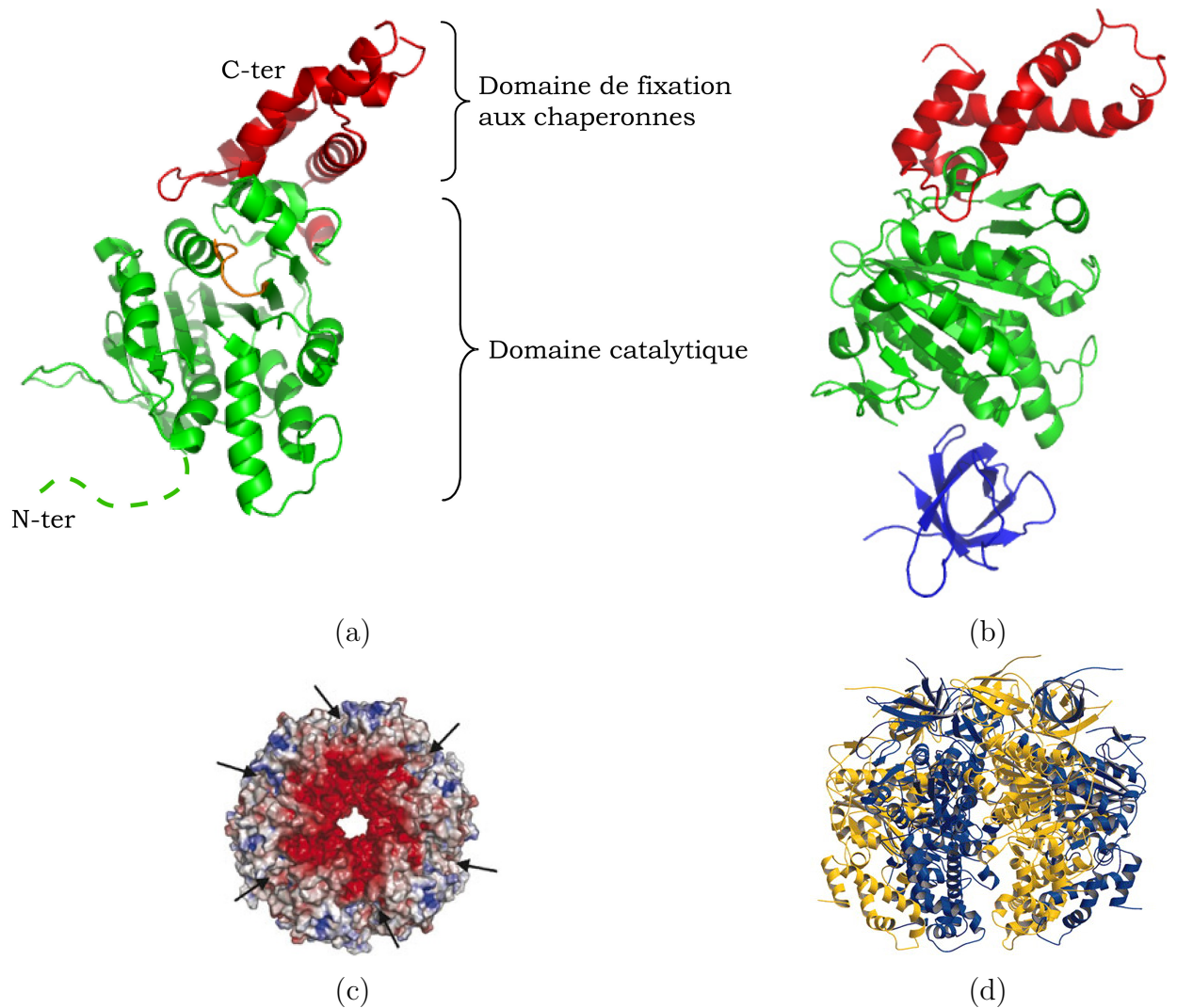


FIG. 4.6 – **Structure cristallographique du monomère tronqué de l'ATPase et modèle de la forme hexamérique assemblée en anneau.** (a) Structure cristallographique de *EscN*($\Delta 1 - 108$) (code PDB 2OBL). Elle révèle 2 domaines structuraux et fonctionnels distincts. Le domaine catalytique est représenté en vert et la boucle où se lie l'ATP est colorée en orange, alors que le domaine de liaison aux chaperonnes est représenté en rouge. (b) Structure cristallographique de *FliI*($\Delta 1 - 18$) (code PDB 2DPY). On y voit, en plus de ce qui est décrit dans la structure de *EscN*, un tonneau β N-terminal (en bleu) qui fait partie de la zone d'association à la membrane et est impliquée dans l'oligomérisation de l'ATPase. (c) Modèle de *EscN* construit *in silico* par les auteurs qui suggère l'assemblage en anneau hexamérique de la forme entière de *EscN*. Les zones colorées en rouge correspondent aux zones chargées négativement, celles en bleu les zones chargées positivement. Les flèches indiquent les sites de liaison de l'ATP (D'après ZARIVACH et al., 2007 [Zar2007]). (d) Modèle de *FliI* assemblé en hexamère (d'après IMADA et al., 2007 [Ima2007]).

la F₁-ATPase, l'intérieur du pore est chargé négativement (figure 4.6-c).

En se basant sur des analogies entre les F₁-ATPases et EscN, les auteurs proposent que la fixation de l'ATP au niveau du domaine catalytique induise un changement conformationnel des hélices α du domaine de fixation aux chaperonnes qui conduirait à la dissociation du complexe entre la chaperonne et l'effecteur et à la sécrétion de ce dernier.

4.3.3 L'aiguille de sécrétion

Description générale

L'aiguille de sécrétion est une structure creuse hélicoïdale formée d'un homopolymère d'une centaine de copies d'une petite protéine d'environ 9 kDa [Cor2006] ; PscF chez *P. aeruginosa*. L'aiguille mesure environ 500 Å chez cette bactérie [Pas2005]. Elle est trop étroite (son diamètre interne mesure environ 25 Å) pour que les effecteurs puissent la traverser sous leur forme repliée ; ils doivent être partiellement dépliés pour passer à travers l'aiguille de sécrétion [Ste2001, Fel2002]. Chez *Y. enterocolitica*, une structure similaire a été mise en évidence [Hoi2001]. Elle mesure 600-800 Å de long et 60-70 Å de large (son diamètre interne mesure environ 20 Å). Elle est formée d'un homopolymère d'une petite molécule, YscF. Chez de nombreuses autres bactéries à Gram négatif dotées d'un système de sécrétion de type III, des protéines orthologues à PscF, avec qui elles partagent autour de 25% d'identité de séquence, ont un rôle semblable (figure 4.7).

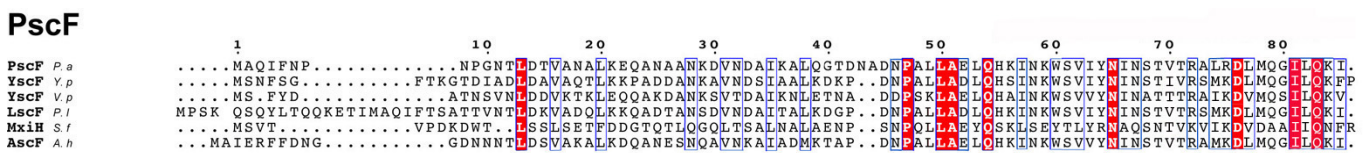


FIG. 4.7 – *Alignement de séquences entre PscF chez P. aeruginosa et des protéines orthologues chez d'autres bactéries dotées d'un injectisome de la famille Ysc : Y. pestis, V. parahaemolyticus, P. luminescens, S. flexneri et A. hydrophilia. Les résidus identiques sont notés en rouge et ceux qui sont homologues sont encadrés en bleu. L'alignement a été réalisé à l'aide de ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).*

Les paramètres hélicoïdaux de l'aiguille ont été déterminés chez *S. flexneri* dans les laboratoires de BLOCKER et LEA dans lesquels la structure de l'aiguille de sécrétion chez cette bactérie a été analysée par microscopie électronique à une résolution de 16 Å [Cor2003]. Ainsi, 5.6 sous-unités forment un tour d'hélice et celui-ci s'accompagne d'un déplacement de 24 Å le long de l'axe hélicoïdal. Ces paramètres sont semblables à ceux du flagelle [Mim1995, Sam2001], bien que, pour ce dernier, la sous-unité qui polymérise soit de plus grande taille (la flagelline a une masse molaire de 45 kDa) et ne partage pas d'homologies de séquences avec la sous-unité de l'aiguille de type III [Cor2003].

Rôle pour la régulation de T3SS

Chez *Y. pestis*, PLANO et son équipe [Tor2005] proposent sur la base de travaux de mutagenèse dirigée que YscF polymérisée en aiguilles à la surface de *Y. pestis* joue également un rôle dans la détection du contact avec la cellule-cible et de la déplétion en calcium du milieu extra-cellulaire, deux éléments activateurs du T3SS chez *Y. pestis* [Ros1994, Mic1990]. Ceci pourrait se produire par l'intermédiaire d'une modification conformationnelle des monomères de l'aiguille, qui serait ensuite transmise jusqu'au système de régulation du T3SS situé à la base de l'injectisome [Dea2006]. L'aiguille de type III serait donc une structure multifonctionnelle, qui participerait à la fois à la sécrétion de toxines et à la régulation de cette sécrétion.

Caractère antigénique

De plus, le caractère antigénique de YscF a été étudié [Swi2005]. Pour cela des souris immunisées contre YscF ont été infectées avec la souche CO92 de *Y. pestis*. Après 15 jours d'infection, 60% des souris préalablement immunisées contre YscF ont survécu alors que ce n'est le cas pour aucune du groupe témoin non immunisé contre YscF. De plus, des taux importants d'anticorps dirigés contre YscF ont pu être détectés par Western Blot dans le sérum des souris immunisées contre YscF. Ces résultats montrent que l'immunisation contre YscF a un rôle protecteur contre *Y. pestis*, cette protéine pourrait donc être étudiée dans le cadre d'un vaccin.

Etude structurale du monomère

Chez le flagelle bactérien, la délétion des extrémités terminales de la flagelline conduit à une forme monomérique de celle-ci [Sam2001]. Chez *S. flexneri*, une forme monomérique de MxiH a été étudiée [Dar2006]. Les auteurs ont montré que les résidus à l'extrémité C-terminale de MxiH sont nécessaires à sa polymérisation et que la délétion des 5 derniers résidus en C-terminal permet l'obtention de MxiH sous une forme monomérique soluble. Ce même résultat a également été observé pour PrgI et BsaL, protéines qui forment l'aiguille de sécrétion de type III chez *S. typhimurium* et *Burkholderia pseudomallei* respectivement [Dar2006, Wan2007]. Le spectre de dichroïsme circulaire suggère que MxiH^{Δ5} est repliée en hélices α . Cependant cette forme monomérique est moins stable que la forme sauvage polymérisée de MxiH. Ceci suggère que l'incorporation de MxiH dans les aiguilles en formation s'accompagne d'une augmentation de la stabilité des protéines. Le même phénomène est observable pour PscF [Qui2005] et sera développé dans la partie traitant des résultats (chapitre 12, p. 145).

La structure de MxiH^{Δ5} a été résolue par cristallographie des rayons X à 1,9 Å de résolution [Dea2006]. Elle est repliée en 2 hélices α courbées antiparallèles (figure 4.8) reliées par une courte boucle Pro-Ser-Asp-Pro. Son domaine N-terminal n'est pas visible sur la carte de densité électronique ; il est flexible bien que prédit comme étant hélicoïdal par les programmes de prédiction de séquence secondaire (PSIpred). Afin d'expliquer que cette partie soit désordonnée dans la structure du monomère, les auteurs proposent que :

- soit les 5 résidus tronqués à l'extrémité C-terminale, nécessaires à la polymérisation, sont nécessaires au repliement de l'hélice α N-terminale,
- soit le repliement de l'hélice α N-terminale intervient au moment de la polymérisation de MxiH, qui serait tout d'abord transportée partiellement dépliée à travers l'aiguille. Cela serait compatible avec le faible diamètre interne de l'aiguille (environ 20 Å), qui ne permet que le passage d'une seule hélice et non d'une structure entièrement repliée.

Parmi les 2 formes cristallographiques de MxiH, l'une a son extrémité C-terminale repliée en hélice α alors que pour l'autre, cette partie non visible sur la carte de densité électronique est flexible.

Les structures des monomères de PrgI^{Δ5} et de BsaL^{Δ5} ont été résolues par RMN

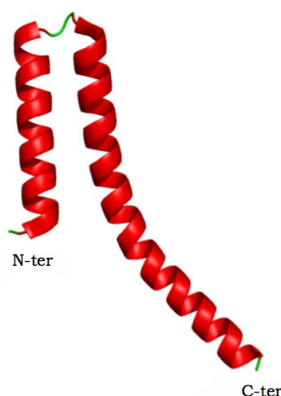


FIG. 4.8 – **Structure cristallographique de $MxiH^{\Delta 5}$ dotée d'un C-ter replié.** Elle a été déterminée à une résolution de 1,9 Å [Dea2006] (code PDB 2CA5). Elle est constituée de 2 hélices α antiparallèles. Les 5 résidus à l'extrémité C-terminale ont dû être tronqués afin d'obtenir une forme soluble ; ils sont supposés se replier en hélice α également.

[Zha2006, Wan2007]. Dans les 2 cas, les extrémités terminales sont flexibles. Les domaines centraux de ces structures, conservés, composés de 2 hélices α connectées par une courte boucle, se superposent bien (rmsd $1.1 \pm 0.3 \text{ \AA}$). Ainsi ces structures possèdent une partie centrale bien repliée (la "tête") et des extrémités terminales flexibles [Blo2007].

Il est à noter que cette structure est très similaire au domaine D0 de la flagelline [Yon2003, Dea2006] qui sera étudié ultérieurement (chapitre 6, p. 91), ce qui suggère que les processus d'assemblage du flagelle et de l'aiguille de type III pourraient être semblables.

Description de l'assemblage chez *S. flexneri*

La structure cristallographique de $MxiH^{\Delta 5}$ qui possède son extrémité C-terminale repliée en hélice α a été placée par les auteurs dans la carte de densité électronique à une résolution de 16 Å de l'aiguille de sécrétion de type III de *S. flexneri* obtenue par microscopie électronique [Cor2003, Dea2006] (figure 4.9). Ceci en fait la première description détaillée de l'assemblage d'une aiguille de sécrétion de type III. La partie manquante dans la structure à l'extrémité N-terminale a été

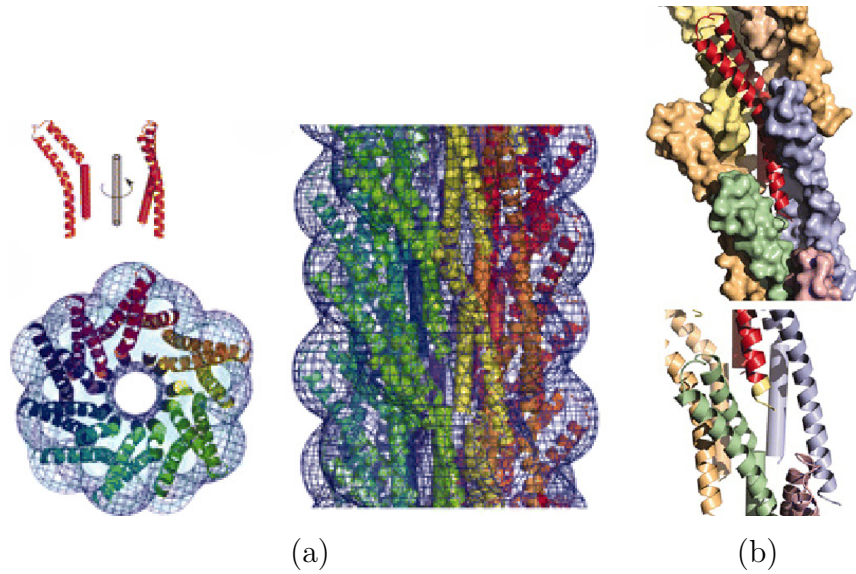


FIG. 4.9 – *Description de l'assemblage de MxiH au sein de l'aiguille de sécrétion de type III de S. flexneri.* (a) Positionnement de la structure cristallographique de MxiH à l'intérieur de la carte de densité de l'aiguille de type III de *S. flexneri*. (b) Interactions entre monomères de MxiH dans le modèle assemblé (d'après DEANE et al., 2006 [Dea2006]).

modélisée comme une extension de l'hélice α de l'extrémité N-terminale visible, ce qui est compatible avec la place disponible dans la carte de densité électronique.

Chaque molécule de MxiH est entourée de 7 molécules voisines identiques et il existe de fortes interactions entre l'extrémité C-terminale d'un monomère et les trois autres résidus qui l'entourent (figure 4.9-b). Les contacts entre monomères se font par le biais d'interactions hydrophobes.

La partie de MxiH modélisée par une hélice N-terminale borderait le canal interne alors que la partie C-terminale est entièrement enfouie dans l'assemblage, ce qui pourrait expliquer les défauts de polymérisations entraînés par des délétions dans cette partie. La "tête" des monomères, elle, est exposée à la surface de l'aiguille.

Selon cet assemblage, les monomères de MxiH sont dans la même orientation que dans le modèle du flagelle (chapitre 6). Cependant, l'extrémité C-terminale de MxiH occupe ici l'extérieur de l'aiguille (figure 4.9-a) alors que le domaine C-D0 de la flagelline forme l'intérieur du flagelle (figure 6.4-b) [Yon2003].

La précision de ce modèle est cependant limitée par la résolution de 16 Å de l'assemblage étudié par microscopie électronique. Ainsi, si la position de la chaîne principale et éventuellement celle des chaînes latérales exposées est précise, la position des chaînes latérales des résidus enfouis l'est beaucoup moins et les propriétés physico-chimique dépendantes des chaînes latérales (comme le potentiel électrostatique) ne peuvent donc pas être décrites [Blo2007].

Processus d'assemblage

Une fois la base assemblée, les monomères de l'aiguille de sécrétion sont exportés à travers la base puis polymérisent en aiguille [Kub1998].

Lorsque la longueur fonctionnelle de l'aiguille est atteinte, les monomères de l'aiguille de sécrétion cessent à leur tour d'être sécrétés en faveur des molécules de virulence (protéines translocatrices et toxines) [Suk2001].

Modèles proposés pour la régulation de la taille de l'aiguille

La régulation de la taille de l'aiguille de sécrétion est fondamentale pour la cytotoxicité de la bactérie puisqu'elle est nécessaire à l'injection des facteurs de virulence bactériens dans la cellule-cible. En effet, la longueur de l'aiguille doit correspondre à la somme des longueurs des adhésines bactériennes (protéines monomériques ou oligomériques ancrées dans la membrane externe, YadA chez *Y. enterocolitica* [Hoi2000]) et des récepteurs cellulaires sur lesquels les adhésines prennent appui (le récepteur cellulaire pour YadA n'a pas été identifié [Cor2006]) [Mot2005]. Ainsi au sein d'une même bactérie, la variation de la taille des aiguilles n'excède pas 20% [Cor2006].

Deux modèles principaux pour la régulation de la taille de l'aiguille de sécrétion sont actuellement envisagés dans la littérature [Jou2003, Mar2006] :

1. Le premier est fondé sur une protéine sécrétée qui servirait de règle moléculaire, de la famille de YscP. Il s'adapte bien aux injectisomes de la famille Ysc.
2. Un autre modèle a été développé dans le laboratoire de GALAN pour des injectisomes de la famille Inv-Mxi-Spa. Il est fondé sur la polymérisation simultanée de la tige liant les deux anneaux de la base et de l'aiguille de sécrétion de type III.

Modèle de la règle moléculaire

Ce modèle a été développé chez *Y. pestis* dans le laboratoire de CORNELIS [Jou2003], où la longueur des aiguilles a été mesurée par microscopie à coloration négative. Il a été montré que des mutants de *Y. pestis* chez qui le gène codant pour YscP a été délété sont incapables de réguler la taille des aiguilles de type III et qu'aucune sécrétion d'effecteurs n'est observée. Il en est de même lorsque les 35 résidus en N-terminal ou les 130 résidus en C-terminal de YscP sont délétés. De plus, au cours de ce même travail, une relation linéaire a été mise en évidence entre le nombre de résidus du domaine YscP³⁶⁻³⁰⁶ chez la protéine sauvage et la longueur de l'aiguille de sécrétion selon :

$$\text{longueur de l'aiguille} = 1.9 \text{ \AA} \times \text{nombre de résidus de YscP du domaine YscP}^{36-306} \text{ chez la protéine sauvage}$$

D'autre part, il est nécessaire que YscP soit sécrétée afin qu'elle puisse contrôler la taille de l'aiguille [Agr2005b].

En outre, chez *Y. enterocolitica*, où le gène codant pour YscP est plus long que chez *Y. pestis*, l'aiguille de sécrétion est, elle aussi, plus longue (580 Å ± 100 Å chez *Y. enterocolitica* et 410 Å ± 80 Å chez *Y. pestis*).

YscP est par ailleurs détectée en association aux aiguilles tout juste polymérisées, alors que cette protéine n'est plus détectée chez les aiguilles fonctionnelles sécrétant les effecteurs de *Y. pestis*, les Yops.

La protéine YscP est supposée avoir 3 domaines fonctionnels distincts :

- en N-terminal, un domaine S d'environ 130 résidus,
- un domaine central d'environ 400 résidus qui joue le rôle de règle moléculaire,
- en C-terminal, un domaine nommé T3S4 d'environ 90 résidus qui est conservé chez le flagelle bactérien [Agr2005a].

Les auteurs proposent que YscP se fixe par son extrémité C-terminale à la base de l'injectisome et par son extrémité N-terminale à l'extrémité distale de l'aiguille qui polymérise. Lorsque la longueur de l'aiguille fonctionnelle est atteinte (580 Å chez *Y. pestis*), 1.9 Å séparent 2 résidus voisins du domaine central qui est alors dans une conformation relativement étendue et ne peut pas se replier en hélice α . En effet, la distance entre 2 résidus d'une hélice α est d'environ 1.5 Å et la distance maximale entre 2 résidus consécutifs d'une chaîne étendue est de 3.8 Å [Cra1992]. Un signal est alors délivré qui est transmis à la base de l'injectisome et conduit à

l'arrêt de la sécrétion de YscF et le début de la sécrétion des protéines de virulence. Dans ce modèle, YscP est supposée se positionner à l'intérieur de l'aiguille en cours de polymérisation. Cependant, en considérant l'étroitesse du canal interne (environ 20 Å), il est difficile d'envisager le passage des sous-unités de YscF simultanément à la présence de YscP dans ce même canal.

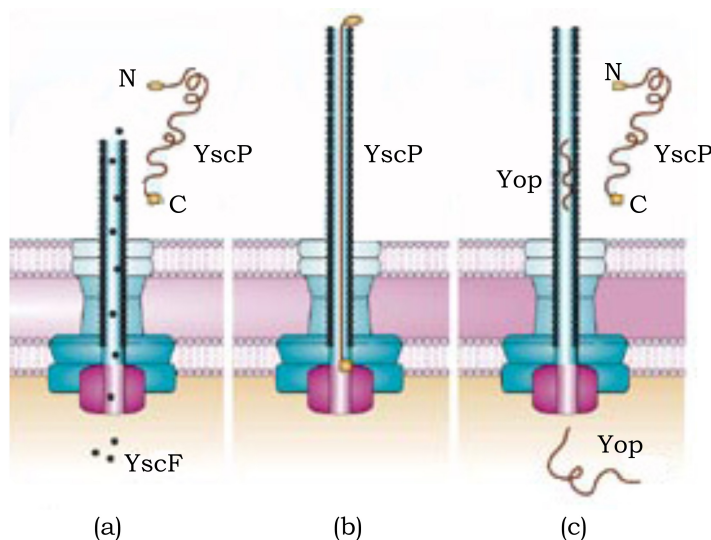


FIG. 4.10 – **Alternative dynamique au modèle de la règle moléculaire.** *YscP* serait sécrétée aléatoirement pendant la sécrétion des monomères de l'aiguille de sécrétion afin de sonder la longueur de celle-ci en cours de polymérisation. (a) Lorsque l'aiguille est trop courte, *YscP* est sécrétée. (b) Lorsque l'aiguille a atteint sa taille fonctionnelle, *YscP* peut se fixer aux 2 extrémités de l'aiguille. 1,9 Å séparent alors 2 résidus consécutifs. (c) Un changement de spécificité permet alors la sécrétion des molécules de virulence, après la sécrétion de *YscP*. (D'après CORNELIS [Cor2006]).

Une alternative dynamique a donc été proposée par CORNELIS [Cor2006] (figure 4.3.3), selon laquelle YscP n'est pas fixée en permanence à l'intérieur du canal mais fonctionne comme une sonde sécrétée alternativement avec les sous unités de l'aiguille. Si l'aiguille est trop courte, YscP ne peut pas se fixer et est sécrétée. La fixation de YscP à l'intérieur de l'aiguille lorsque celle-ci a atteint sa taille fonctionnelle conduit au changement de spécificité des molécules sécrétées en faveur des molécules de virulence, après le décrochement de YscP et son relargage dans le domaine extracellulaire.

Des études montrent que ce mécanisme s'applique également à la régulation de la longueur du crochet flagellaire, système proche du T3SS où la protéine FliK joue le rôle de règle moléculaire [Shi2007].

Modèle de polymérisation simultanée de la tige liant les deux anneaux de la base et de l'aiguille

Chez *S. typhimurium* et *S. flexneri*, la délétion du gène *invJ* ou *spa32* respectivement, codant pour des protéines orthologues de YscP, conduit à de très longues aiguilles dont la taille n'est pas régulée, et qui sont incapables de sécréter les molécules de virulence [Kub2000, Mag2002]. De plus, des études menées chez *S. typhimurium* dans le laboratoire de GALAN par cryomicroscopie électronique ont montré que dans les souches délétées de *invJ*, la base de l'injectisome ne comporte pas la tige reliant les 2 anneaux, ni la structure en forme de prise¹ qui stabilise la tige interne [Mar2006].

Suite à leurs observations, les auteurs ont pu proposer un modèle selon lequel InvJ stabilise la prise et la tige interne qui polymérise simultanément avec l'aiguille de sécrétion (figures 4.3 et 4.3.3).

Dans un premier temps, les sous-unités de l'aiguille de sécrétion (PrgI chez *S. typhimurium*) et les sous unités de la tige dans la base de l'injectisome (PrgJ chez *S. typhimurium*) sont sécrétées simultanément.

Lorsque la tige a fini de polymériser et qu'elle atteint l'anneau ancré dans la membrane externe de la bactérie, un signal déclenche le changement de spécificité des molécules sécrétées; les sous-unités de l'aiguille et celle de la tige interne ne sont plus sécrétées et l'aiguille cesse donc de polymériser.

Ce modèle suppose que la proportion des sous-unités de l'aiguille et de la tige présents dans le cytoplasme est parfaitement régulée, afin que le rapport entre les longueurs de l'aiguille et de la tige soit constant. Cette hypothèse est de plus soutenue par l'observation faite chez *S. typhimurium* et *S. flexneri* (de la famille des injectisomes Inv-Mxi-Spa) que la surexpression des sous-unités de l'aiguille conduit à des aiguilles anormalement longues [Tam2000]. Cependant, ce phénomène ne se produit pas chez *Y. pestis* (famille des injectisomes Ysc, [Sor], non publié), ce qui laisse supposer des différences possibles de régulation selon les classes d'injectisomes [Cor2006].

¹de l'anglais "socket"

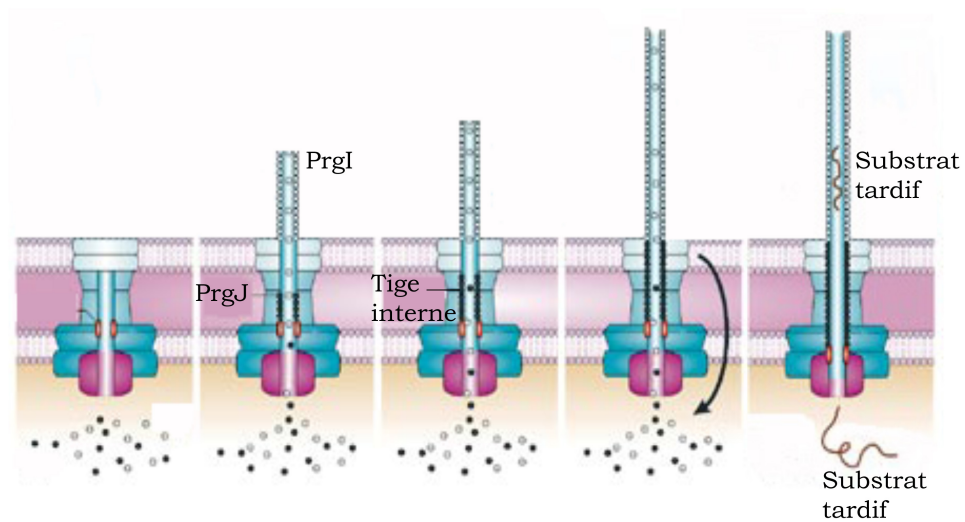


FIG. 4.11 – *Modèle de polymérisation simultanée de la tige interne de la base et de l'aiguille de sécrétion.* Les monomères de l'aiguille et de la tige interne de la base sont sécrétés simultanément et leurs polymérisations sont concomitantes. Lorsque la tige a fini de polymériser et qu'elle a atteint l'anneau ancré dans la membrane externe, l'aiguille a également atteint sa taille fonctionnelle et un signal provoque l'arrêt de la sécrétion à la fois des monomères de la tige interne et de l'aiguille (d'après CORNELIS [Cor2006] et GALAN [Mar2006]).

4.3.4 "Plate-forme" à l'extrémité de l'aiguille

LcrV est une protéine sécrétée par le T3SS de *Y. pestis*. Elle est nécessaire à la formation de pores fonctionnels dans la membrane des cellules infectées [Gou2005]. Cette protéine est donc fondamentale pour la fonctionnalité du T3SS.

Son intérêt réside de plus dans son fort pouvoir antigénique. En effet, FRANK et son équipe [Saw1999] ont montré qu'après avoir été immunisées avec PcrV, l'orthologue de LcrV chez *P. aeruginosa*, 100% des souris survivent après 1 semaine à l'infection causée par une dose mortelle de la souche virulente PA103 de *P. aeruginosa*. Les auteurs ont en outre montré que les anticorps produits par les souris et dirigés contre PcrV empêchent la translocation de la toxine ExoY. PcrV pourrait ainsi être utilisée pour lutter contre de nombreuses infections causées par *P. aeruginosa* (infections suite à des brûlures ou infections chroniques des poumons) [Hol2001]. Un vaccin à base d'anticorps anti-LcrV est en outre en phase II d'étude aux Etats-Unis. Cependant, un vaccin efficace et sûr qui protégerait de la peste n'est pas encore disponible [Phi2007].

La structure cristallographique de LcrV a été résolue [Der2004]. Cette protéine a une forme d'haltères, avec 2 hélices α antiparallèles associées en *coiled-coil*² ainsi que deux motifs globulaires aux deux extrémités du *coiled-coil* (figure 4.12).

Plus récemment, CORNELIS et son équipe [Mue2005] ont montré que cette protéine s'associe à l'extrémité de l'aiguille de sécrétion de *Y. pestis*, formant ainsi un complexe qui pourrait assurer la continuité entre l'aiguille de sécrétion et le pore de translocation [Mot2006]. De plus, les auteurs ont montré par des expériences de pontage chimique que LcrV est capable d'interagir avec YscF. Enfin, des anticorps dirigés contre LcrV viennent se fixer spécifiquement à l'extrémité distale de l'aiguille de sécrétion. Ceci pourrait expliquer l'action protectrice de ces anticorps et comment ils empêchent la translocation des molécules de virulence [Saw1999]. Un tel complexe pourrait également exister chez *P. aeruginosa* et *A. salmonicida* [Mot2006].

Dans les laboratoires de LEA et BLOCKER, un modèle de LcrV assemblé en

² *Coiled-coil* : motif structural fréquemment rencontré chez les protéines qui consiste en l'assemblage de 2 à 6 hélices α qui s'enroulent les unes autour des autres afin de former une super-hélice (le plus souvent gauche). Les hélices qui s'assemblent en coiled-coil présentent généralement des répétitions de 7 résidus et la surface d'interaction entre les hélice est hydrophobe, souvent riche en leucines [Mai2003].

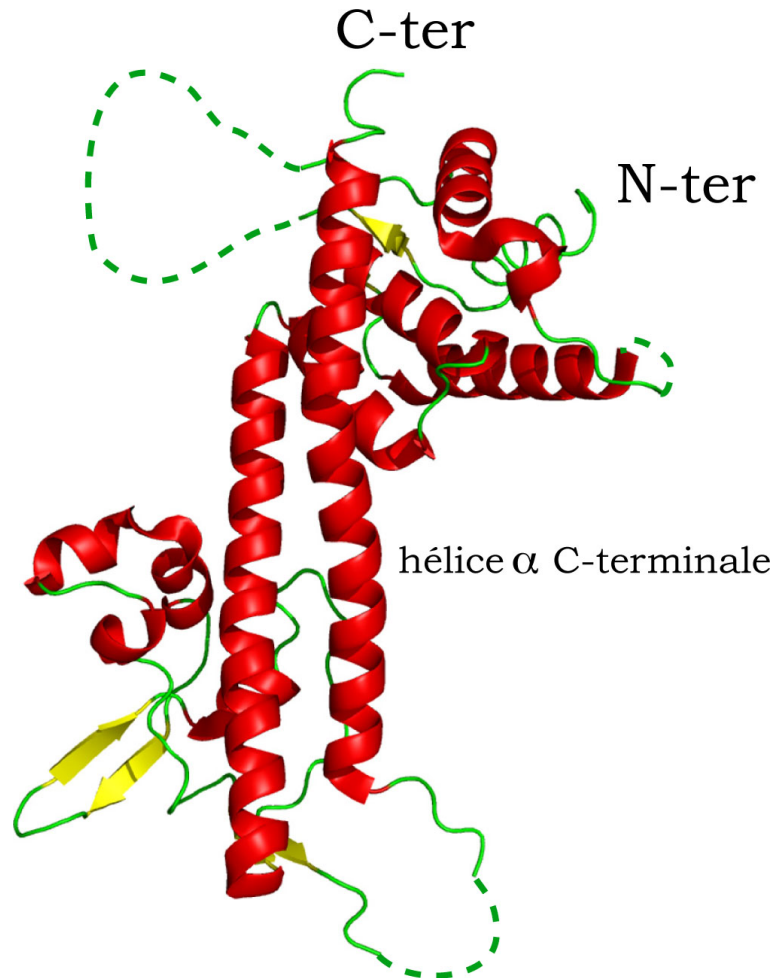


FIG. 4.12 – *Structure cristallographique de LcrV*. Elle a été déterminée à une résolution de 2.2 Å (code PDB 1R6F [Der2004]). Les hélices α sont représentées en rouge, les brins β en jaune et les boucles en vert. Les parties non visibles sur la carte de densité électronique sont représentées sous forme de tirets. LcrV possède 2 hélices α centrales assemblées en coiled-coil avec deux domaines globulaires de part et d'autre, ce qui fait penser à une forme d'haltères.

pentamère a pu être positionné à l'extrémité distale du modèle de l'aiguille de *S. flexneri*, en supposant que ces assemblages sont semblables [Dea2006]. Les interactions impliquées se font sans conflit stérique entre les molécules et autorisent la présence de 5 molécules de LcrV à l'extrémité de l'aiguille. Ce modèle est compatible avec les observations faites par microscopie électronique à coloration négative [Mue2005] qui positionnent LcrV à l'extrémité des aiguilles de YscF.

Or, l'hélice α C-terminale de LcrV est superposable à l'hélice α C-terminale de MxiH [Dea2006]. Cette observation a conduit les auteurs à proposer un modèle selon lequel un pentamère de LcrV interagit avec les sous-unités de YscF par l'intermédiaire des hélices α C-terminales de LcrV qui occupent la place des hélices α C-terminales de YscF. Chez *S. flexneri*, il a été vérifié par délétions que de la même façon IpaD s'associe à l'extrémité distale des aiguilles par l'intermédiaire de l'hélice α C-terminale de IpaD [Esp2006, Vee2007] (Table des protéines orthologues du T3SS p.52).

Chez *S. flexneri*, il a été montré par des études de mutagenèse que des résidus dans la région de la boucle PSNP (Asn43, Pro44, Leu47 et Tyr50) dans la protéine de l'aiguille sont impliqués dans l'interaction entre l'aiguille et la structure oligomérique de IpaD [Ken2005, Zha2007].

De plus, les mêmes auteurs proposent que ce complexe situé à l'extrémité distale de l'aiguille joue un rôle dans la détection du contact avec la cellule-cible et l'assemblage du pore de translocation. En effet, chez *S. flexneri*, dans le laboratoire de BLOCKER, IpaB et IpaD ont été détectées dans des échantillons d'aiguilles purifiées. Ainsi, IpaB se lie à l'extrémité distale des aiguilles purifiées par l'intermédiaire de IpaD [Vee2007].

Un modèle plus récent a été établi dans les laboratoire de LEA et BLOCKER après la résolution de la structure de IpaD chez *S. flexneri* [Joh2006a] (code PDB 2j0o). Les auteurs proposent que le complexe situé à l'extrémité distale de l'aiguille soit constitué d'un homotétramère de IpaD qui se lie aux molécules de l'aiguille, MxiH, par l'intermédiaire de leurs extrémités C-terminales. A lui viendrait s'ajouter 1 molécule de IpaB afin de refermer l'aiguille et bloquer ainsi la sécrétion des effecteurs. L'activation du T3SS suite au contact avec la cellule-cible par le biais du domaine C-terminal de IpaB ouvrirait le pentamère et permettrait donc la sécrétion des molécules de virulence.

D'autre part, EspA est l'orthologue de LcrV chez *E. coli* et cette protéine

polymérise en un filament qui se positionne à l'extrémité de l'aiguille de sécrétion de type III, formant ainsi une structure intermédiaire entre cette dernière et le pore de translocation [Dan2001]. Elle joue également le rôle d'extension de l'aiguille, ce qui permet à *E. coli* d'infecter les cellules intestinales recouvertes d'un épais mucus [Knu1998]. *In vitro*, EspA polymérise spontanément ; elle est maintenue sous une forme monomérique par un complexe 1:1 avec sa chaperonne CsaA dans le cytoplasme bactérien [Yip2005a].

La structure du complexe EspA:CsaA a été résolue en 2005 dans le laboratoire de STRYNADKA [Yip2005a] (figure 4.13). EspA comporte deux grandes hélices α

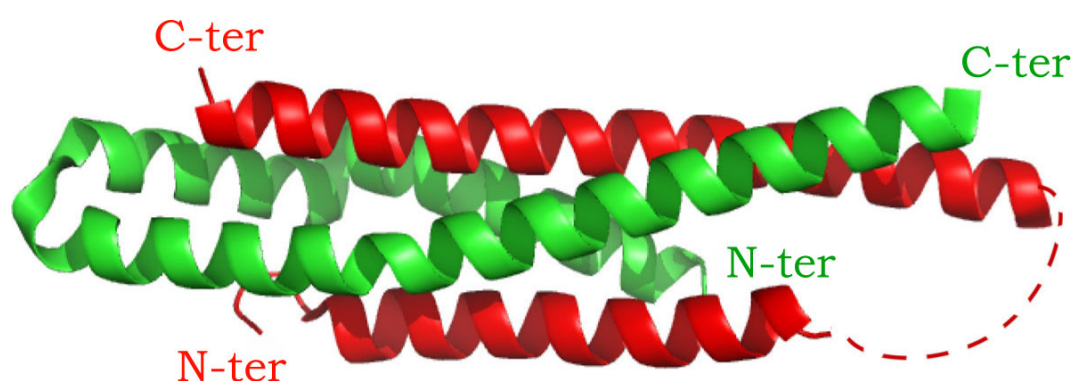


FIG. 4.13 – *Structure cristallographique de EspA (en rouge) en complexe avec sa chaperonne CsaA (en vert)*. Elle a été déterminée à une résolution de 2.8 Å (code PDB 1XOU). Elle révèle le repliement hélicoïdal des 2 protéines. EspA s'enroule autour de sa chaperonne dans un état partiellement déplié comme le montrent les zones où la densité électronique qui correspondrait à EspA n'est pas interprétable, qui sont ici représentées sous forme de tirets.

antiparallèles, reliées par une région de liaison peu structurée qui n'est pas visible dans la carte de densité électronique. Sa chaperonne CsaA est repliée en 3 hélices α . Dans ce complexe, EspA s'enroule autour de CsaA, masquant ainsi le domaine de polymérisation de la première.

4.3.5 Le pore de translocation

Afin d'entrer dans la cellule infectée, les toxines sont transloquées à travers un pore de translocation constitué de protéines bactériennes et formé dans la mem-

brane de la cellule-cible après contact entre cette dernière et la bactérie [Blo1999, Ney1999].

Trois protéines sont nécessaires à la formation de ce pore *in vivo*, dont deux sont membranaires [Ney1999] (PopB et PopD chez *P. aeruginosa* [Sch2003], YopB/YopD chez *Y. pestis* [Ney1999]) et une troisième est hydrophile, soluble (PcrV chez *P. aeruginosa* [Gou2004], LcrV chez *Y. pestis* [Nil1997]). En outre, chez *Y. pestis*, les complexes LcrV:YopB ou LcrV:YopD ont été co-purifiés dans le laboratoire de CORNELIS [Sar1998] ; ces trois protéines interagissent.

PopB possède deux régions transmembranaires et PopD une seule. La présence conjointe de ces 2 translocateurs est nécessaire pour la formation du pore de translocation [Blo1999].

Avant leur oligomérisation, PopB et PopD sont maintenues sous forme monomérique par leur chaperonne commune PcrH dans le cytoplasme bactérien [Sch2003].

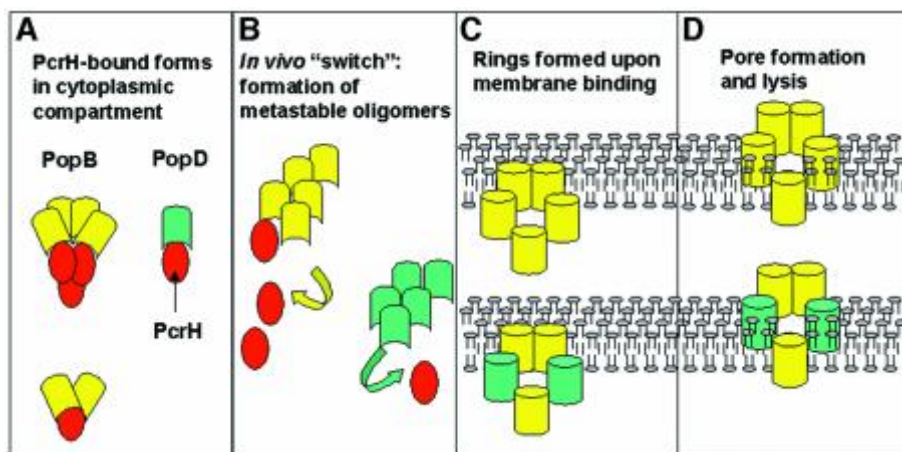


FIG. 4.14 – **Modèle proposé pour la formation du pore de translocation chez *P. aeruginosa*.** (a) Dans le cytoplasme bactérien, *PcrH* empêche l'agrégation prématurée de *PopB* et *PopD*. (b) La formation d'oligomères de *PopB* et *PopD* suit le relargage de leur chaperonne *PcrH*. (c) Association d'hétérooligomères au contact de la membrane de la cellule-cible. (d) Insertion du pore de translocation (d'après SCHOEHN et al., 2003 [Sch2003]).

Observées par microscopie électronique à coloration négative en présence de membranes artificielles, les protéines translocatrices forment des anneaux de 80 Å de large qui présentent une cavité de 40 Å de diamètre [Sch2003]. Leur structure et

leur stœchiométrie demeurent cependant inconnues, et en particulier aucun pore formé dans une cellule-cible par un injectisome fonctionnel n'a pu être observé par microscopie électronique.

In vivo, en l'absence de PcrV, PopB et PopD ne sont pas capables former des pores dans les membranes des cellules-cible [Gou2004, Gou2005]. *In vitro*, PopB et PopD seules sont cependant capables de s'insérer dans des membranes artificielles (liposomes), et d'y former des anneaux [Sch2003].

Au moment de leur sécrétion, les protéines translocatrices transitent par l'aiguille de sécrétion sous une forme partiellement dépliée, non liées à leur chaperonne. A l'extrémité de l'aiguille, elles oligomérisent en une structure annulaire qui s'associe potentiellement à la membrane de la cellule infectée avant de s'y insérer [Sch2003] (figure 4.14). Chez *S. flexneri*, l'interaction entre IpaB et IpaD (homologues de PopB et PcrV chez *P. aeruginosa* respectivement) est un élément clé pour l'assemblage du pore de translocation [Vee2007]. Aucune donnée concernant la hiérarchie de la sécrétion des translocateurs n'est cependant disponible.

4.4 Connaissances structurales et fonctionnelles sur les chaperonnes du T3SS

Les protéines chaperonnes du T3SS se lient spécifiquement dans le cytoplasme bactérien aux protéines effectrices ou aux protéines qui forment l'injectisome de sécrétion, avant que ces dernières soient fonctionnelles, afin de les stabiliser. L'absence d'une chaperonne se traduit généralement par l'absence de sécrétion de la protéine qui lui est associée [Fel2003]. Après la sécrétion de l'effecteur, la chaperonne correspondante reste dans le cytoplasme bactérien [Che1999, Wat1996].

L'affinité des chaperonnes pour leur substrat est très grande, de l'ordre du nanomolaire [Che1999, Luo2001, Yip2005a]. La dissociation de ces complexes, nécessaire au relargage du substrat au moment de sa sécrétion, nécessite donc beaucoup d'énergie, qui serait fournie par l'hydrolyse de l'ATP en ADP par l'AT-Pase située à la base de l'injectisome de sécrétion [Ste2001]. Ces mécanismes de dissociation impliquant l'ATPase ne sont cependant pas complètement élucidés. Ils ont été exposés dans la section précédente.

Les chaperonnes sont généralement des molécules petites (poids moléculaire

≤15kDa) et acides [Wat1994].

On distingue 3 classes de chaperonnes du T3SS selon le type de protéines qui leur est associé [Pag2002, Cor2006] :

Les chaperonnes de classe I se lient à l'effecteur dont elles sont spécifiques par un domaine de liaison aux chaperonnes situé au niveau des 100 premiers résidus de l'extrémité N-terminale de l'effecteur. Le gène codant pour ce type de chaperonnes est généralement positionné à coté de celui codant pour l'effecteur associé. Bien que les séquences des chaperonnes de classe I soient peu conservées, leur repliement en 5 feuillets β et 3 hélices α , lui, l'est dans les structures résolues de SycE en complexe avec YopE [Bir2001] (code PDB 1l2w), SicP avec SptP [Ste2001] (code PDB 1jyo) ou encore les chaperonnes CesT (code PDB 1k3e) et SigE [Luo2001] (code PDB 1k3s). Les chaperonnes de classe I se présentent sous la forme d'homodimères auxquelles les protéines effectrices se lient en s'enroulant autour d'elles dans une conformation relâchée. Elles réguleraient également la synthèse d'effecteurs (la présence de chaperonnes libres favoriserait la synthèse de nouveaux effecteurs) [Dar2001, Mav2002] et pourraient organiser la hiérarchie de sécrétion des protéines de l'injectisome et des toxines [Wat1993]. Aucune donnée expérimentale directe concernant ces 2 derniers aspect n'est cependant disponible.

Les chaperonnes de classe II se lient aux protéines translocatrices dans le but de bloquer leur oligomérisation prématurée [Sch2003] et d'inhiber leur toxicité pour la bactérie [Ney1999, Wat1996]. Parmi elles, chez *P. aeruginosa*, la chaperonne PcrH est capable de lier les deux translocateurs PopB et PopD [Sch2003]. Peu de données concernant ces chaperonnes ont été mises en évidence ; aucune structure tridimensionnelle n'a été résolue à ce jour. La structure de PcrH est cependant prédite en "tetratrico peptide repeat" (TPR)³, de même que toutes les chaperonnes de type II. Il est supposé que chez *Y. pestis*, l'hélice amphiphile de YopD se fixerait au niveau de la face concave du domaine TPR de LcrH (orthologue chez *Y. pestis* de PcrH) [Pal2003].

Les chaperonnes de classe III se lient aux protéines destinées à polymériser

³motif TPR : motif hélicoïdal de 34 résidus repliés en 2 hélices α liées par une courte boucle et qui forment l'unité de base. Un domaine TPR est constituée de 3 à 16 motifs TPR (3 est le nombre le plus fréquent) auxquels est ajoutée une hélice de solvation à l'extrémité C-terminale [Mai2003].

dans le domaine extra-cellulaire afin de former l'aiguille de sécrétion. La fonction de telles chaperonnes est notamment d'empêcher la polymérisation prématurée de sa protéine partenaire dans le cytoplasme bactérien en masquant des domaines impliqués dans la polymérisation afin de la maintenir dans une forme monomérique compatible avec sa sécrétion [Auv2001, Yip2005a]. Les protéines PscE et PscG étudiées dans cette thèse bloquent la polymérisation prématurée de PscF dans le cytoplasme bactérien [Qui2005] ; elles s'inscrivent donc dans cette classe de chaperonnes.

Dans les structures de ces complexes impliquant des chaperonnes de type III, le domaine de liaison se situe à l'extrémité C-terminale du partenaire. Ainsi, chez le flagelle, FliS inhibe la polymérisation de FliC en se liant à l'extrémité C-terminale de FliC [Ben2000], et dans le cas du T3SS chez *E. coli*, la polymérisation prématurée de EspA qui forme l'extension de l'aiguille de sécrétion est inhibée par la fixation de sa chaperonne CesA à l'extrémité C-terminale de EspA [Yip2005a].

Dans le cas de ces deux derniers complexes, la protéine partenaire s'enroule autour de sa chaperonne afin de rester sous une forme monomérique dans le cytoplasme bactérien (figure 4.15).

4.5 Conclusions sur le système de sécrétion de type III

Le T3SS est une machinerie particulièrement complexe, constituée de plus de 25 protéines différentes. Certaines forment l'injectisome de sécrétion qui est composé d'une base ancrée dans la double membrane bactérienne et de l'aiguille de sécrétion. Le pore de translocation ancré dans la membrane de la cellule-cible permet l'injection des toxines dans celle-ci. D'autres sont des protéines régulatrices, d'autres enfin des protéines chaperonnes qui prennent en charge les précédentes dans le cytoplasme bactérien. Au delà d'importantes caractéristiques partagées par les T3SS des différentes bactéries qui en sont dotées, une certaine variabilité apparaît entre ces dernières.

De nombreuses connaissances relatives à ce système ont été acquises ces dernières années d'un point de vue structural et fonctionnel, grâce notamment à la reconstruction par cryo-microscopie électronique de la base de l'injectisome, à la

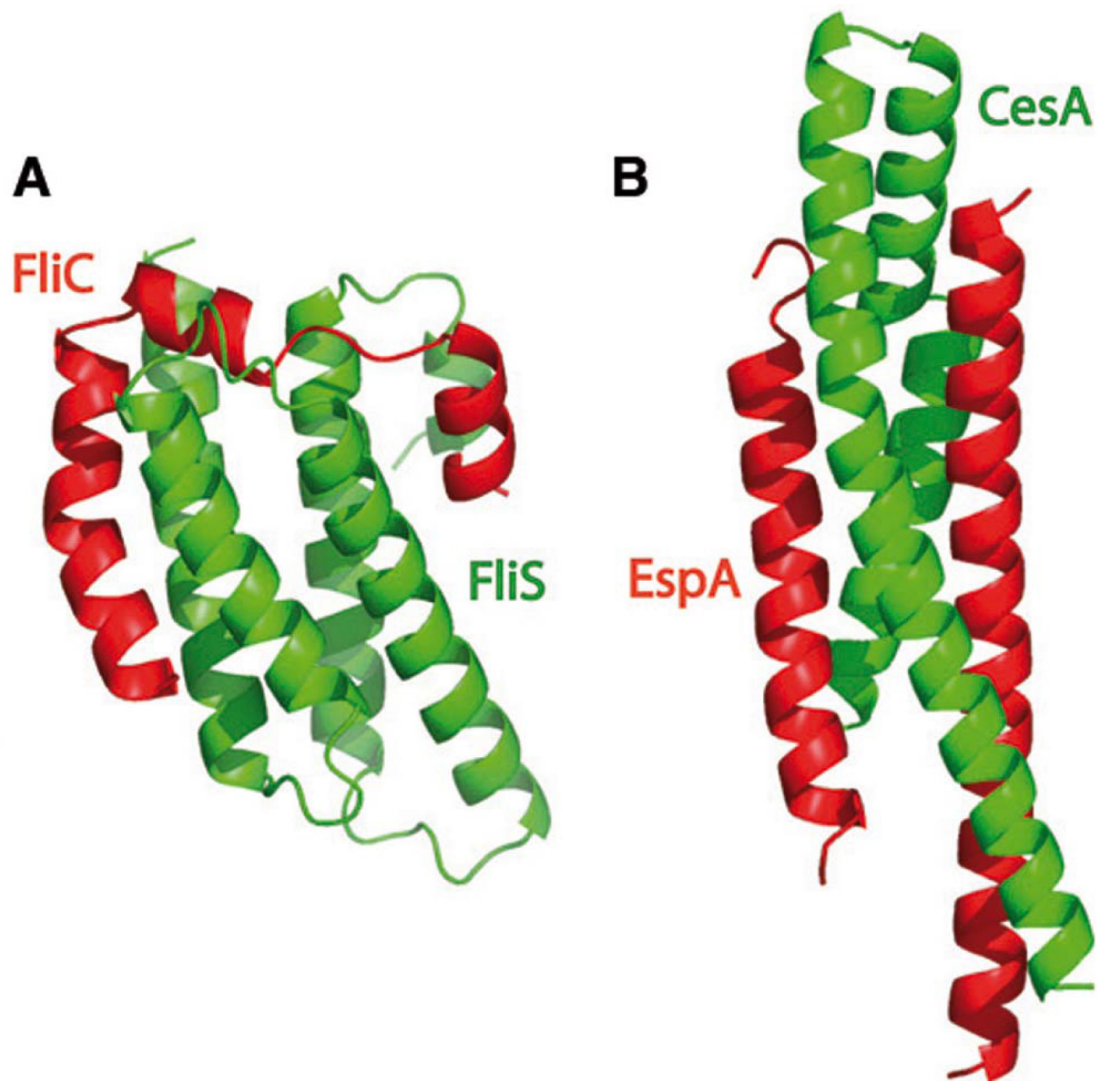


FIG. 4.15 – *Structures cristallographiques de molécules destinées à polymériser (en rouge) maintenue sous forme monomérique par leur chaperonne (en vert).* (a) Complexe $\text{FliC}^{464-518}:\text{FliS}$ chez le flagelle (code PDB 1ORY). (b) Complexe $\text{EspA}:\text{CesA}$ chez le T3SS de *E. coli* (code PDB 1XOU). Dans les 2 cas, la molécule destinée à polymériser (*FliC* ou *EspA*) s'enroule autour de sa chaperonne. La partie C-terminale de *FliC* qui interagit avec sa chaperonne *FliS* correspond au domaine CD0 de la flagelline (figure 6.3, p. 96).

résolution de la première structure d'une ATPase du système de sécrétion de type III ainsi qu'à la résolution de structures de protéines qui forment l'aiguille de sécrétion chez différentes bactéries accompagnées d'une description de l'assemblage de l'aiguille proposé par les laboratoires de LEA et BLOCKER chez *S. flexneri*. Cependant, les mécanismes de prise en charge du monomère de l'aiguille de sécrétion avant qu'il polymérise restent obscurs, et leur étude fait l'objet de ce travail de thèse.

Chapitre 5

Connaissances sur le pilus de type IV (T4P)

Le système de sécrétion de type IV possède une base ancrée dans la double membrane bactérienne et un pilus qui pointe vers le milieu extra-cellulaire. C'est une caractéristique qu'il partage avec le T3SS et, pour cette raison, la description structurale du pilus de type IV est pertinente ici.

5.1 Description générale et fonctionnalité

Le pilus de type IV est présent chez toutes les bactéries à Gram négatif et est impliqué dans des mécanismes aussi variés que l'adhérence [Bie1998], la mobilité bactérienne [Kai2000], la formation de biofilms [O'T1998] ou encore la transformation d'ADN [Bis1977]. Ainsi, la virulence de la bactérie, qui est amplifiée par ces facteurs, dépend largement du bon assemblage des pili de type IV [Fou2002]. De plus, par leur localisation extra-cellulaire, les pili de type IV sont une cible privilégiée pour le système immunitaire de l'organisme infecté et pourraient constituer une cible intéressante pour la synthèse de nouveaux médicaments [Cra2004].

Le pilus de type IV est structuralement bien décrit dans la littérature puisque la structure tridimensionnelle de la piline a été résolue en 1995 [Par1995] et qu'un modèle pour l'assemblage/desassemblage de la fibre est proposé [Cra2006]. L'assemblage a également été décrit par diffraction de fibres [Fol1981] et microscopie électronique [Cra2006].

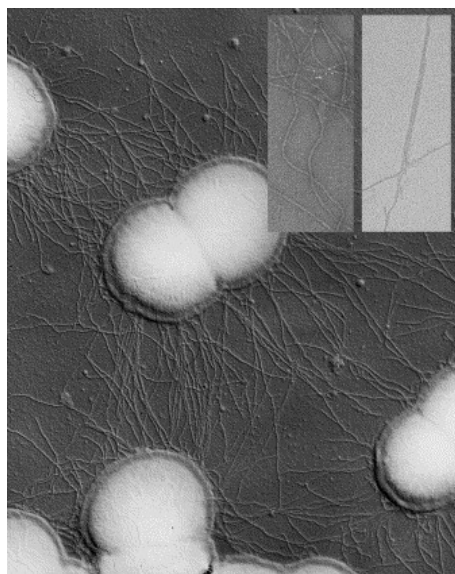


FIG. 5.1 – *Visualisation des pili de type IV à la surface de N. gonorrhoeae par microscopie électronique à coloration négative. Ils mesurent plusieurs μm de long. En vignettes, grossissements des pili (d'après CRAIG et al., 2006 [Cra2006]).*

Le pilus de type IV apparaît sous la forme de filaments très longs ($\geq 1\mu\text{m}$), très fins (diamètre externe 50-80Å) et très solides ($\geq 100\text{pN}$ ¹ [Mai2002]). Afin de former le pilus, plusieurs milliers de copies de la protéine piline polymérisent [Rud1995] dans le cytoplasme après que la séquence protéique pré-piline à l'extrémité N-terminale qui empêche leur polymérisation prématurée ait été coupée par une peptidase [Fil2004]. Elles sont ensuite exportées vers le milieu extra-cellulaire à travers un pore formé dans la membrane externe par la protéine PilQ [Col2005].

La piline de type IV partage des similarités de séquence avec les protéines Pul qui polymérisent afin de former le pseudo-pilus de type II [Pea2003]. En effet, dans ces protéines, les 30 résidus situés à l'extrémité N-terminale sont conservés [Fil2004]. De plus, au delà de ces similarités de séquence, le repliement général de la pseudopiline de type II PulG [Köh2004] est semblable à celui décrit pour la piline de type IV [Par1995].

Il existe 2 sortes de pili ; les pili de type IVa et les pili de type IVb [Cra2004].

1. Les pili de type IVa sont présents chez des bactéries qui infectent les mam-

¹pN : pico Newton, unité de force.

mifères et les plantes. *P. aeruginosa*, en particulier, possède des pili de type IVa constitués de la piline PAK.

2. Les pili de type IVb sont présents chez des bactéries qui infectent l'intestin humain.

5.2 Structure de la piline; brique élémentaire pour l'assemblage de la fibre

5.2.1 Structure générale du monomère

Les structures tridimensionnelles de 3 pilines de type IVa (formes entières de la piline PAK de *P. aeruginosa* [Cra2003] (code PDB 1OQW, figure 5.2.1) et de la piline GC de *Neisseria gonorrhoeae* [Cra2006] (code PDB 2HI2), forme tronquée de la piline K122-4 de *P. aeruginosa* [Kei2001] (code PDB 1HPW)) et 1 structure tridimensionnelle de piline de type IVb (forme tronquée de TcpA de *Vibrio cholerae* [Cra2003] (code PDB 1OQV)) ont été résolues par cristallographie des rayons X ou RMN.

Les structures des formes entières ont été résolues après dissociation des sous-unités de la fibre par des détergents, et cristallisation des protéines ainsi solubilisées. Les structures des formes tronquées ont, elles, été résolues en supprimant les 29 premiers résidus de l'extrémité N-terminale, nécessaires à la polymérisation.

De la comparaison de ces structures, 4 caractéristiques principales émergent (figure 5.2.1) [Cra2004] :

- une longue hélice α N-terminale conservée et un pont disulfure conservé dans le domaine globulaire C-terminal,
- un noyau conservé pour l'assemblage,
- une variabilité structurale de la surface de la partie globulaire,
- différents repliements pour le domaine globulaire entre les pili de type IVa et IVb.

Les données présentées dans la suite de ce chapitre proviennent de 3 publications du laboratoire de TAINER [Cra2003, Cra2004, Cra2006].

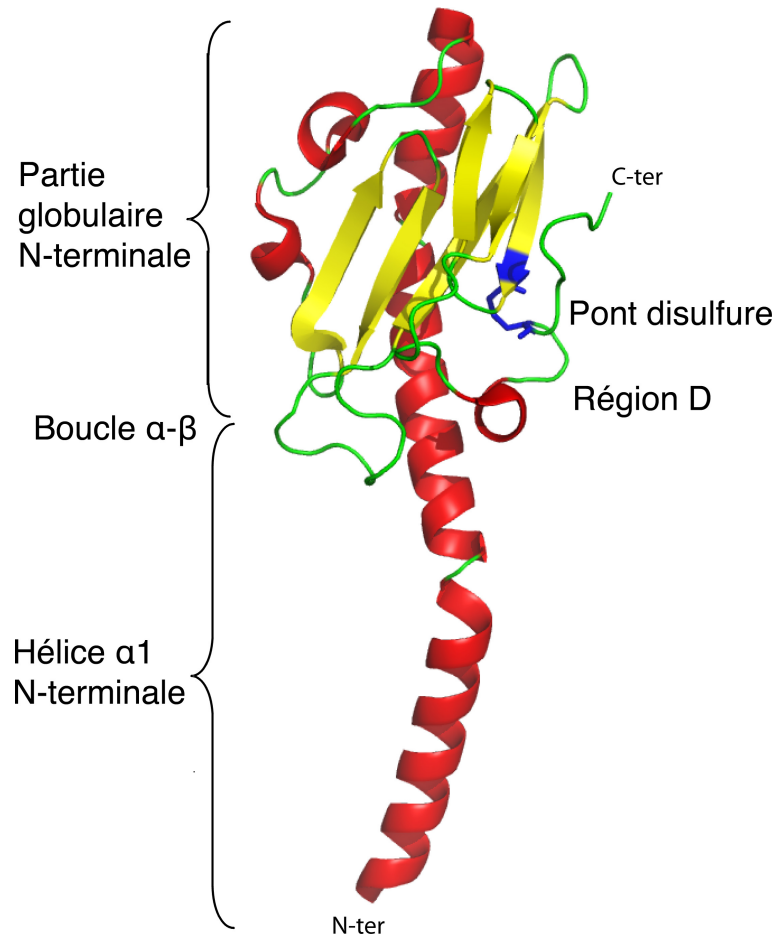


FIG. 5.2 – *Structure cristallographique de la piline GC (code PDB 2HI2).* Les hélices α sont représentées en rouge, les feuillets β en jaune, les boucles en vert et le pont disulfure en bleu. Elle est constituée d'une longue hélice α 1 nécessaire à la polymérisation et d'une tête globulaire comprenant des domaines variables et un pont disulfure très conservé, lui aussi requis pour la polymérisation (d'après CRAIG et al., 2006 [Cra2006]).

5.2.2 L'hélice α N-terminale

L'hélice $\alpha 1$ à l'extrémité N-terminale mesure 85 Å de long. Elle est impliquée dans l'assemblage des pili de type IV puisque c'est elle qui forme le fuseau hydrophobe à l'intérieur des pili [Par1995]. Dans le cas des structures tronquées, c'est la première moitié N-terminale de cette hélice, hydrophobe, qui a été tronquée afin d'obtenir un monomère soluble et de résoudre sa structure par cristallographie des rayons X. La deuxième moitié de l'hélice $\alpha 1$ (environ 53 résidus) est amphiphile. Elle est enfouie dans la tête globulaire par l'intermédiaire de son côté hydrophobe alors que la partie hydrophile est exposée au solvant chez le monomère.

Dans la structure de PAK, l'hélice $\alpha 1$ est courbée par 2 prolines en positions 22 et 42 [Cra2003]. Cette courbure, conservée chez les autres bactéries, confère à la piline une flexibilité requise pour l'assemblage. De plus, la large interface hydrophobe assurée par cette hélice permet la polymérisation de longs filaments à la fois flexibles et solides, caractéristiques des pili de type IV.

5.2.3 La tête globulaire C-terminale

La tête globulaire est constituée de la moitié C-terminale de l'hélice $\alpha 1$ ainsi que d'un feuillet β à 4 brins conservé dans les structures résolues jusqu'à présent, malgré des différences de repliement et des différences de séquence importantes au sein de ce feuillet. Pour les pili de type IVa, la connectivité du feuillet β est en $N \rightarrow N+1$ alors qu'elle est plus complexe pour les pili de type IVb. Ces variations font penser que les pili de type IVa et IVb ne sont pas liés étroitement dans l'évolution, mais ont divergé précocement [Cra2004].

5.2.4 La région D

La région D est une région très variable délimitée par le pont disulfure nécessaire à l'assemblage du pilus. Elle est plus grande chez le pilus de type IVb (environ 55 résidus) que chez le pilus de type IVa (environ 22 résidus).

Dans PAK, cette région permet à la bactérie de se lier aux récepteurs des cellules épithéliales de la rétine et des poumons [Won1995]. Elle présente ainsi un intérêt dans une approche pharmacologique. Cette région serait enfouie dans le cadre du pilus assemblé, mais resterait néanmoins exposée à l'extrémité de celui-ci

[Cra2004].

La région D de TcpA est beaucoup plus grande (elle représente la moitié de la tête globulaire). Elle est importante pour les interactions entre sous-unités qui entrent en jeu dans l'assemblage du pilus.

Dans le cas de la piline GC, la région D est exposée et immuno-réactive. Elle a également un rôle attendu dans l'assemblage du pilus.

5.2.5 La boucle α - β

La boucle α - β est située en face de la région D, dans la tête globulaire. Elle est impliquée dans les interactions entre sous-unités et pourrait être partiellement exposée dans le pilus assemblé.

Globalement, la comparaison des structures de pilines met en évidence une grande variabilité au niveau de la région D et de la boucle α - β , alors que les éléments fondamentaux que sont l'hélice $\alpha 1$ et le pont disulfure sont conservés [Cra2004].

5.3 Description du modèle assemblé du pilus de type IV

Les paramètres hélicoïdaux du pilus de type IV ont été déterminés pour la première fois chez *P. aeruginosa* par diffraction de fibres dans l'équipe de PARANCHYCH [Fol1981]. Plusieurs milliers de molécules de piline polymérisent de façon hélicoïdale pour former le pilus de type IV qui a un diamètre extérieur d'environ 60 Å et un diamètre intérieur de 6 à 11 Å. 1 tour d'hélice est formé par 5.6 sous-unités et s'accompagne d'une translation de 41 Å le long de l'axe principal du pilus.

La structure du pilus GC a été décrite à 12.5 Å de résolution par microscopie électronique [Cra2006] et un modèle du pilus assemblé a ainsi pu être reconstruit en positionnant la structure de la forme entière de la piline à l'intérieur de la carte de densité de microscopie électronique. Les auteurs proposent que le pilus se présente sous la forme d'un faisceau de 3 hélices α , le départ de chacune d'elles étant décalé de 10.5 Å. Ces trois hélices forment un *coiled-coil* qui confère une

grande résistance mécanique au filament. La surface externe du pilus présente d'importants sillons (figure 5.3), capables potentiellement de lier d'autres molécules (ADN, protéines, carbohydrates). Dans une approche pharmacologique, ces sillons pourraient également représenter des zones de fixation possibles pour de petites molécules qui viendraient bloquer la fonctionnalité du pilus. Les surfaces davantage exposées représentent, elles, des zones antigéniques variables.

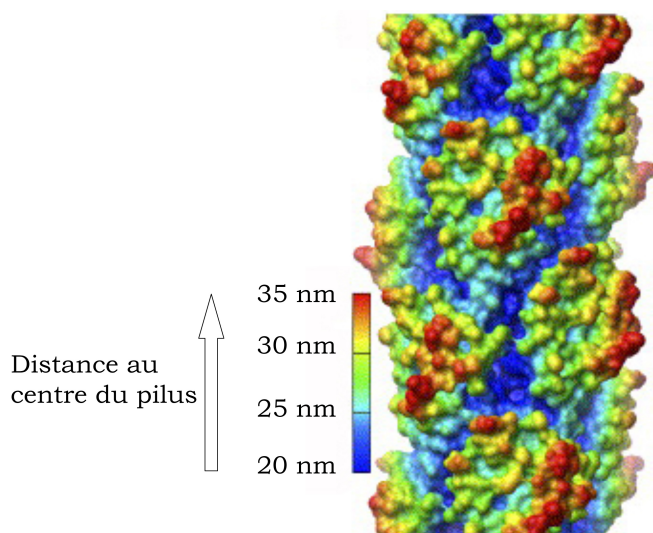


FIG. 5.3 – **Modélisation de la surface du pilus de type IV.** Il présente de profonds sillons où de l'ADN ou des petites molécules peuvent se fixer. A l'opposé, les surfaces exposées vers l'extérieur peuvent elles être reconnues par d'autres molécules, comme des molécules du système immunitaire de l'organisme-hôte. Les couleurs donnent l'information de la distance en nm de la surface par rapport au centre du pilus (d'après CRAIG et al., 2006 [Cra2006]).

Les interactions hydrophobes sont nombreuses et fondamentales pour le bon assemblage du pilus. En particulier, un large canal hydrophobe, vide de solvant, occupe le centre du pilus. Les interactions entre sous-unités le long des surfaces hydrophobes impliquent par ailleurs 75% des 4000Å² enfouis par molécule de piline.

On remarque également la présence d'un unique pont salin entre le glutamate 5 du résidu N et la phenylalanine 1 du résidu N+1 ; cette interaction polaire qui avait déjà été envisagée par TAINER et son équipe [Par1995] contribue elle aussi aux interactions entre sous-unités.

D'autre part, l'espace disponible entre les têtes globulaires et au niveau du canal au coeur du filament confère la flexibilité nécessaire à l'assemblage du pilus.

5.4 Vers un modèle d'assemblage/désassemblage

L'assemblage/désassemblage rapide des pili de type IV (croissance d'1 $\mu\text{m/s}$) est un phénomène nécessaire à la mobilité bactérienne [Mer2000]. De plus, le désassemblage du T4P est nécessaire à la transformation d'ADN chez *N. gonorrhoeae* [Aas2002]. Le modèle proposé par TAINER et son équipe [Cra2006] est le suivant :

Dans un premier temps, les sous-unités sont solubilisées au niveau de la membrane plasmique interne par contacts hydrophobes entre l'hélice $\alpha 1$ et la bicouche lipidique de la membrane d'une part, et par contacts électrostatiques entre la tête globulaire chargée positivement et les groupes phospholipidiques chargés négativement d'autre part. Les sous-unités sont ensuite additionnées à la base du filament en phase de croissance par diffusion et force électrostatique.

Puis une ATPase située à la base du pilus de type IV hydrolyse l'ATP en ADP+Pi, ce qui produit un effet de piston sur une protéine partenaire de liaison à la membrane ("*Membrane binding protein*", MBP), suite à quoi le filament est translaté de 10.5 Å vers l'extérieur.

Enfin, l'ATP remplace l'ADP lié et la MBP revient à sa position de repos.

Ce mécanisme, proposé dans le cadre de l'étude du pilus de type IV de *N. gonorrhoeae*, est de plus généralisable aux autres pili de type IV. Seule la distance d'extrusion varie en fonction de la taille de la tête globulaire (la distance d'extrusion correspond à 1/3 de la taille de la tête globulaire).

Ce mécanisme est réversible, le désassemblage du pilus est initié par la rétraction de l'ATPase [Mer2000].

5.5 Conclusions sur le pilus de type IV

Dans ce chapitre, nous avons exposé les connaissances structurales et fonctionnelles relatives au pilus de type IV qui, comme l'aiguille de sécrétion de type III, est une structure polymérisée qui pointe vers l'extérieur de la bactérie. Les pili

de type IV forment de longs filaments de 5.6 résidus par tour d'hélice, ce qui est semblable à ce qui a été calculé pour l'aiguille de type III.

Nous avons tout d'abord étudié la structure de la piline, sous-unité du pilus, qui possède des éléments très conservés comme l'hélice α N-terminale et le pont disulfure, et des régions variables.

Nous avons souligné le rôle majeur de l'hélice α N-terminale hydrophobe pour la polymérisation du pilus. Celle-ci se positionne en effet à l'intérieur de la fibre. Elle est impliquée dans les interactions hydrophobes entre monomères.

La polymérisation des molécules de piline intervient dans le cytoplasme, la fibre est ainsi progressivement extrudée vers le milieu extra-cellulaire. Ce modèle autorise l'assemblage/désassemblage rapide des pili de type IV nécessaire à leur fonctionnalité.

Chapitre 6

Connaissances sur le flagelle

Le flagelle et le système de sécrétion de type III possèdent des caractéristiques d'assemblage communes et pourraient dériver d'un ancêtre commun [Kub1998, Aiz2001, Gop2003] (chapitre 4). Pour ces raisons nous présenterons dans ce chapitre les connaissances structurales sur le flagelle, ainsi que la description de l'assemblage et le modèle de polymérisation de cette super-structure proposés à ce jour.

6.1 Description générale

Le flagelle permet la mobilité cellulaire chez les organismes procaryotes et eucaryotes [Mac1984]. De nombreuses analogies existent entre le flagelle bactérien et le système de sécrétion de type III [Blo2003]. En particulier, les séquences d'une dizaine de protéines structurales du T3SS sont similaires aux séquences de protéines du flagelle [Hue1998].

Dans les deux systèmes, des chaperonnes dédiées jouent un rôle fondamental en prenant en charge leurs effecteurs respectifs avant la sécrétion de ces derniers. Les loci des gènes codant pour ces chaperonnes sont en outre proches de ceux des protéines qui leur sont associées.

L'énergie nécessaire à la sécrétion des protéines flagellaires (à l'exception de celles qui sont ancrées dans la membrane bactérienne externe) est fournie par l'hydrolyse de l'ATP par une ATPase située à la base du flagelle, dans le cytoplasme bactérien [Mac1996].

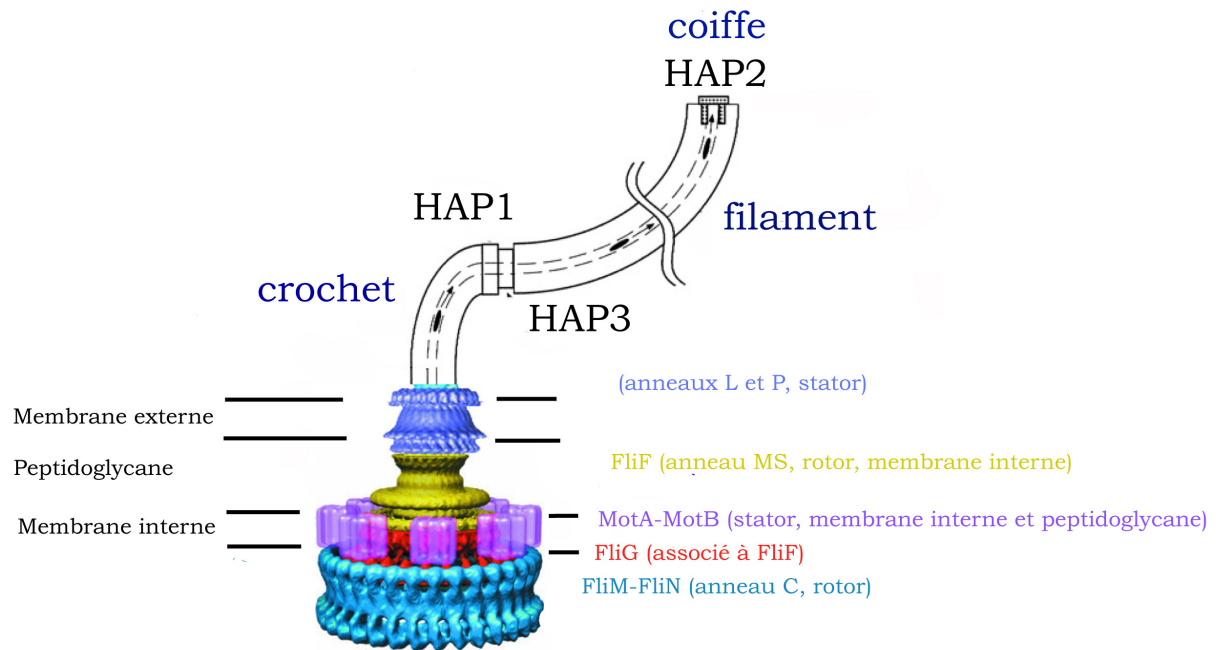


FIG. 6.1 – *Schéma de l'assemblage du flagelle bactérien.* Il est constitué d'une base ancrée dans la membrane bactérienne et qui tourne, surmontée d'un crochet qui transmet le mouvement de rotation au filament flagellaire à l'extérieur de la bactérie. Le filament est lui-même surmonté d'une coiffe qui assiste la polymérisation (adapté de YONEKURA et al., 2000 [Yon2000] et THOMAS et al., 2006 [Tho2006]).

Le flagelle est constitué de 3 parties principales [DeP1971] (figure 6.1). De l'intérieur vers l'extérieur, ce sont la base ancrée dans la double membrane bactérienne, le crochet puis le filament (figure 6.1).

La rotation du "moteur" à la base du flagelle, transmise au crochet puis au filament, permet un déplacement rectiligne de la cellule s'il tourne dans le sens antihoraire ou un changement de direction s'il tourne dans le sens horaire [Lar1974] (figure 6.1).

Chez les bactéries à Gram négatif, la base est ancrée dans la double membrane bactérienne grâce à 3 anneaux [Tho2001, Tho2006] : les anneaux L et P, fixes, sont ancrés dans la membrane externe et le peptidoglycane respectivement et jouent un rôle de stator. L'anneau MS, mobile, au niveau de la membrane interne, joue un rôle de rotor et permet au système de tourner. L'extension cytosolique de cet anneau est appelé l'anneau C.

Chez *S. typhimurium*, parmi les 24 protéines qui composent le flagelle bactérien, FliM et FliN forment l'anneau C (environ 34 copies de FliM et 100 copies de FliN) [Tho1999] qui mesure environ 480 Å de diamètre et 165 Å de haut et a une symétrie d'ordre 32 à 36 [Tho2006]. FliF oligomérisé pour former l'anneau MS et une autre protéine, FliG, serait liée à la face cytoplasmique de FliF pour former un lien avec l'anneau C [Tho2006].

Les protéines HAP1 et HAP3 (*Hook Associated Protein* : protéines associées au crochet) assurent la jonction entre le crochet et le filament, alors que la protéine HAP2 constitue la coiffe du flagelle, nécessaire à la polymérisation correcte de la flagelline puisqu'elle bloque la fuite des molécules de flagelline dans l'espace intercellulaire et assiste l'assemblage des monomères [Ike1984, Yon2000].

Enfin, le filament flagellaire pointe vers le domaine extra cellulaire. Il mesure environ 15 µm de long et a un diamètre externe de 120-150 Å [O'B1972, Mim1995]. Il est constitué d'un homopolymère d'environ 30000 molécules de flagelline, une protéine d'environ 45 kDa [Yon2000]. Cet assemblage hélicoïdal comporte 5.5 résidus par tour d'hélice [Sam2001], ce qui est semblable à ce qui a été décrit pour les pili de type III et de type IV (5.6 résidus par tour dans les 2 cas [Cor2003, Fol1981]).

Le filament flagellaire est également décrit comme une super-structure tubulaire à 11 protofilaments, de même polarité et presque colinéaires [O'B1972]. On distingue 2 types de filaments, de type L ou de type R selon le sens d'enroulement

de la super-hélice.

NAMBA et son équipe ont, les premiers, décrit l'assemblage du filament par cryo-microscopie électronique [Yon2000] (figure 6.2). Le coeur du filament est constitué par le tube interne D0 à une distance comprise entre 15 Å et 30 Å du centre du filament et d'un tube externe entre 35 Å et 60 Å du centre du filament. Les domaines externes D2 et D3 s'étendent entre 60 Å et 115 Å du centre du filament (figure 6.2-a,b).

A son extrémité distale, le filament est recouvert par une coiffe de forme pentagonale (vue de dessus), formée d'un pentamère de HAP2 (figure 6.2-c), liée au filament par 5 domaines d'accroche qui s'intercalent entre 5 dents formées par les domaines D1 des protéines de flagelline.

Les auteurs suggèrent qu'au delà de cette interaction, les extrémités désordonnées des molécules de HAP2 pénètrent davantage dans le filament où elles pourraient interagir avec les domaines D0 des molécules de flagelline de façon à stabiliser l'interaction entre le filament et la coiffe. En effet, des mutations visant à enlever les extrémités de HAP2 empêchent la fixation de la coiffe sur le filament.

L'un des 5 espaces entre ces 5 domaines est plus grand que les autres et n'est par conséquent pas comblé par les indentations formées par les domaines D1 des molécules de flagelline. Cet espace pourrait permettre le passage d'une unique molécule de flagelline de l'intérieur vers l'extérieur du canal du flagelle à l'extrémité distale du flagelle en cours de polymérisation.

6.1.1 Structure de la flagelline

La flagelline, tout comme la piline de type IV ou la sous-unité de l'aiguille de type III, polymérise spontanément. La résolution de sa structure par cristallographie des rayons X a donc nécessité au préalable le clivage des résidus situés aux 2 extrémités de la protéine. La structure d'un fragment monomérique de F41 de *S. typhimurium* a été résolue à une résolution de 2.0 Å dans le laboratoire de NAMBA [Sam2001] (figure 6.3).

La structure se décompose en 3 domaines principaux :

1. Le domaine D1 qui comprend les résidus 56-176 du côté N-terminal (ND1) ainsi que les résidus 402-450 du côté C-terminal (CD1). Il est constitué de 3 grandes hélices α ainsi que d'un brin β . Il mesure 70 Å de long et 20 Å de

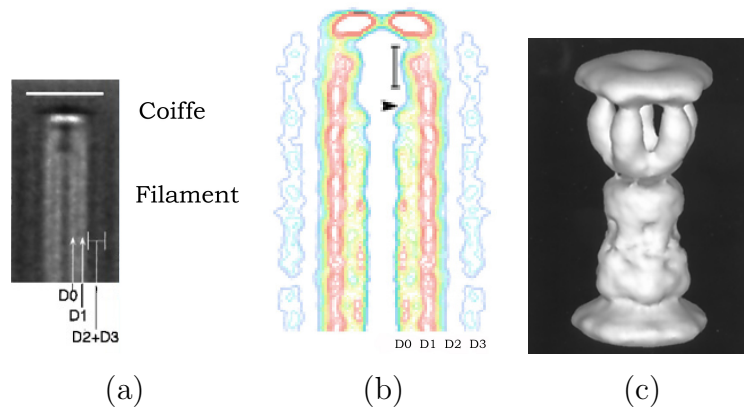


FIG. 6.2 – **Filament et coiffe du flagelle.** (a) Cliché de microscopie électronique à coloration négative du filament flagellaire. (b) Coupe de la densité électronique observée mettant en évidence la continuité de densité au niveau des tubes D0 et D1 et l'élargissement du canal interne à l'extrémité distale du flagelle (flèche) due à la disparition de la densité électronique correspondant au tube D0. (c) Reconstruction tridimensionnelle de la coiffe du flagelle par cryo-microscopie électronique qui met en évidence le pentamère de HAP2 (d'après YONEKURA et al., 2000 [Yon2000]).

large et engendre une large interface hydrophobe.

2. Le domaine D2 qui comprend les résidus 177-189 (ND2) ainsi que les résidus 284-401 (CD2). Cette région est surtout composée de feuillets β , on y distingue 3 régions hydrophobes. Cette région peut être subdivisée en 2 sous-régions D2a et D2b. D2a est constituée de la partie N-terminale de D2 ainsi que de la première moitié de sa région C-terminale; D2b correspond à la 2ème moitié C-terminale du domaine D2 (figure 6.3-b). Ces 2 sous-régions interagissent par leurs surfaces hydrophobes et l'interface entre les 2 sous-domaines constitue la troisième région hydrophobe du domaine D2. Ce type de repliement n'avait pas été décrit auparavant et a été nommé ' β folium'.
3. Le domaine D3 qui comprend les résidus 190-283 est principalement replié en feuillets β et a un repliement similaire à celui du sous-domaine D2a avec des brins β qui semblent être orientés aléatoirement. Le domaine D3 n'est pas indispensable pour la polymérisation du filament mais stabilise ce dernier en maximisant les contacts entre sous-unités.

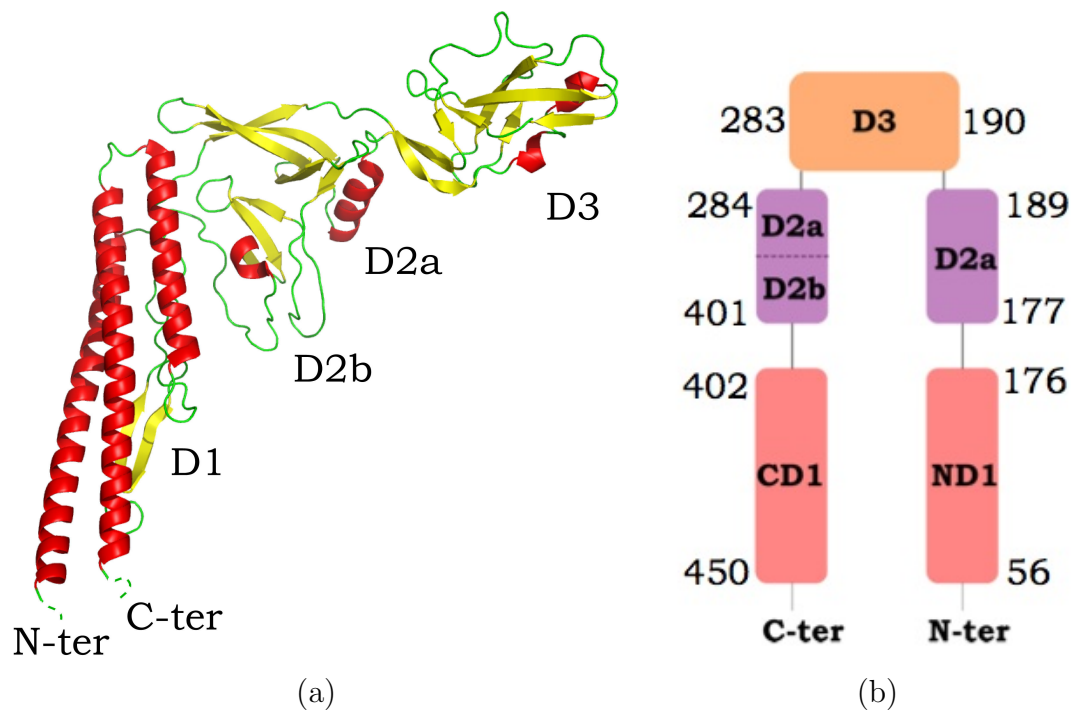


FIG. 6.3 – *Structure du monomère de flagelline F41 (code PDB 1IO1) [Sam2001]. (a) Structure cristallographique de F41 à une résolution de 2.0 Å. Les hélices α sont représentées en rouge et constituent l'essentiel du domaine D1. Les feuillets β présents dans les domaines D2 et D3 sont représentés en jaune, et les boucles flexibles en vert. (b) Schéma de l'organisation en domaines de F41. Chaque domaine est composé d'une partie N-terminale et d'une partie C-terminale.*

6.1.2 Structure du protofilament

Dans le cristal, le fragment de F41 délété du domaine D0 s'organise en protofilaments. En effet, la distance entre 2 molécules de F41 selon l'axe cristallographique a est de 51.9 Å, alors que pour les protofilaments de type R, la distance entre les sous-unités est de 51.8 Å [Yam1998]. De plus, la densité électronique observée dans le cristal de F41 est identique à celle des données à basse résolution de cryo-microscopie électronique pour le filament [Mim1995]. Ces 2 observations concourent à montrer que dans le cristal, F41 s'organise en protofilaments. Il est cependant incapable de former la super-hélice.

La structure de F41 a ensuite pu être placée dans la carte de microscopie électronique du filament, ce qui a montré une forte similarité entre l'organisation de F41 dans la structure en protofilaments du cristal et dans le filament entier. Les protofilaments s'alignent de façon antiparallèle formant ainsi des feuillets de 115 Å d'épaisseur qui se superposent. Il en résulte des cristaux en plaquettes extrêmement fins ($\sim 10\mu\text{m}$).

Le filament polymérise en un tube interne et un tube externe. Le domaine D1 forme la quasi totalité du tube externe alors que les domaines D2 et D3 se positionnent à l'extérieur. Reste donc le tube interne, formé par le domaine D0 coupé pour l'étude cristallographique de F41.

Le protofilament est une structure peu stable à cause des faibles interactions axiales qui existent uniquement entre le domaine D1 de la sous-unité du dessus et une petite partie du domaine D2a de la sous unité du dessous. Aucun protofilament isolé n'a pu être observé dans des conditions physiologiques pour cette raison. Pour être stable, le protofilament a donc besoin des interactions latérales avec les protofilaments voisins qui peuvent être orientés parallèlement, comme dans le cas de l'assemblage du filament, ou anti-parallèlement, comme c'est le cas dans le cristal.

6.2 Description de l'assemblage

La structure de la flagelline F41 entière ainsi qu'un modèle d'assemblage du filament de type R ont pu être proposés en 2003 dans le laboratoire de NAMBA sur la base d'une carte de densité électronique obtenue par cryo-microscopie électronique

à une résolution de 4 Å et des données cristallographiques du fragment monomérique de F41 (figure 6.4) [Yon2003]. La carte de densité électronique à cette résolution permet en effet de distinguer la chaîne principale ainsi que les chaînes latérales les plus volumineuses.

La structure de la forme entière de F41 (figure 6.3-a) révèle un repliement du domaine D0 en 2 hélices α , l'une correspondant au domaine C-terminal de D0 (CD0) et l'autre à son domaine N-terminal (ND0), organisées en *coiled-coil*. Deux boucles relient les domaines CD0 et ND0 aux domaines CD1 et ND1 respectivement.

La comparaison entre la structure cristallographique du fragment de F41 et la structure à une résolution de 4 Å obtenue par cryo-microscopie électronique montre des modifications dans les domaines D1 et D3 mettant en évidence des déformations induites par l'assemblage du filament ou par l'empilement cristallin. L'hélice du domaine CD1 est en particulier courbée dans le cas du fragment de F41 alors qu'elle est quasiment droite dans le cas de la protéine entière assemblée en filaments.

L'assemblage du tube interne est assuré par des interactions hydrophobes importantes entre les domaines D0 au coeur du filament (figure 6.3-b). L'assemblage du tube externe est lui maintenu par des interactions polaires ou chargées principalement (quelques interactions hydrophobes faibles participent elles aussi à la stabilisation). Peu d'interactions existent entre les tubes internes et externes ; celles-ci apparaissent entre l'extrémité N-terminale du domaine ND0 et la partie C-terminale du domaine CD1 et se présentent sous la forme d'interactions hydrophobes entre les 2 hélices antiparallèles. Ainsi, conformément à ce qui avait été prédit suite à l'identification des répétitions heptaédriques qui laissent supposer la présence de motifs *coiled-coil* aux extrémités de la flagelline, ce sont principalement des interactions hydrophobes qui stabilisent le filament flagellaire.

Le canal au centre du filament flagellaire a un diamètre de 20 Å et sa surface interne est principalement tapissée de résidus polaires avec également la présence d'un résidu chargé positivement ; l'arginine 494.

6.2.1 Modèle d'assemblage du flagelle

L'assemblage du flagelle se fait de façon séquentielle, de l'extrémité proximale vers l'extrémité distale. Cet ordre est assuré par 2 facteurs principaux :

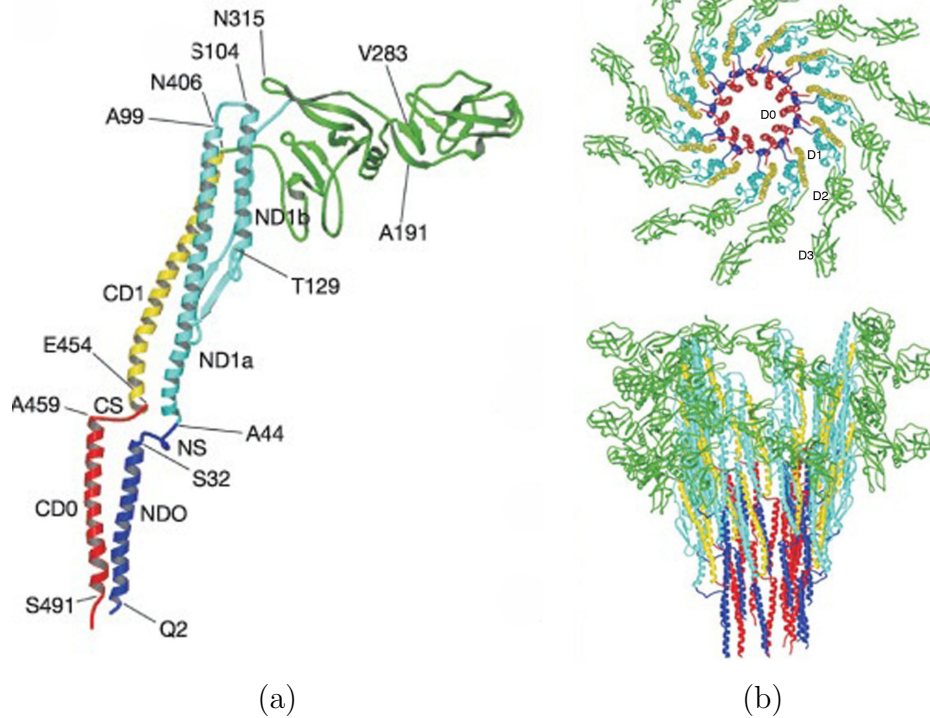


FIG. 6.4 – **Structure cristallographique de F41.** Elle a été déterminée à une résolution de 4 Å par cryo-microscopie électronique (code PDB 1UCU). (a) Structure du monomère montrant le domaine D0 à l'extrémité du domaine D1. Le domaine D0 est principalement hélicoïdal et est lui aussi divisé en une partie C-terminale CD0 et une partie N-terminale ND0, tout comme D1 est divisé en CD1 et ND1. Les résidus du domaine D0 avaient dû être tronqués pour obtenir la forme soluble qui avait permis l'obtention de la structure du fragment de F41 par cristallographie des rayons X. (b) Description de l'assemblage du filament flagellaire. Le domaine D0 forme le tube interne, le domaine D1 forme le tube externe et les domaines D2 et D3 constituent l'extérieur du filament flagellaire (d'après YONEKURA et al., 2003 [Yon2003]).

D'une part, les gènes codant pour les protéines du système flagellaire sont disposés selon la hiérarchie de l'assemblage, de sorte que les sous-unités soient synthétisées au moment d'être utilisées [Fer2006].

D'autre part, il existe des systèmes de régulation de la spécificité du système d'exportation qui régulent l'exportation des protéines par le système d'exportation de type III du flagelle [Min1999].

Assemblage de la base

La première étape de l'assemblage consiste en la formation de la base au niveau de la membrane plasmique bactérienne [Min1999].

A travers cet anneau, des protéines flagellaires peuvent alors être exportées sélectivement grâce à un système d'exportation similaire au système d'exportation de type III [Min1999].

Assemblage du crochet

Lors de l'assemblage du crochet, les molécules polymérisent à l'extrémité distale du crochet. Le complexe protéique HAP1-HAP3 se positionne alors à l'extrémité du crochet, puis lorsque ce dernier a atteint sa longueur fonctionnelle un pentamère de HAP2 vient former une coiffe au dessus du crochet et de HAP1-HAP3 (figure 6.1, p. 92) [Suz1978, Hom1985, Yon2000].

Assemblage du filament

Les molécules de flagelline, après avoir été synthétisées dans la cellule, sont alors exportées à travers le flagelle en cours d'assemblage dans un état partiellement déplié. L'intérieur du canal interne mesure en effet 20 Å de diamètre [Yon2000], ce qui ne permet pas le passage des molécules de flagelline repliées [Mim1995]. En outre, la nature polaire des résidus de la surface interne du canal facilite la diffusion rapide des protéines dépliées qui ont de larges surfaces hydrophobes exposées.

Elles polymérisent à l'extrémité distale du filament en formation [Eme1970] grâce à la 'chambre' à l'extrémité du filament qui ne peut abriter qu'une molécule à la fois et lui permet de se replier en la protégeant de l'agrégation avec d'autres molécules [Yon2000].

La coiffe bloque la fuite des monomères dans l'espace inter-cellulaire avant leur polymérisation ; en cela elle est nécessaire à la polymérisation correcte du flagelle [Yon2000]. On remarque ici une différence avec le T3SS puisque chez ce dernier aucune structure semblable n'a été identifiée. La protéine translocatrice de la famille de LcrV serait en effet un candidat possible pour jouer ce rôle puisque c'est une protéine qui s'associe à l'aiguille de sécrétion [Mue2005, Esp2006]. Cependant, même en l'absence de PcrV, les aiguilles de type III de *P. aeruginosa* se forment [Gou2005]. Cette protéine n'est donc pas nécessaire à la polymérisation de l'aiguille de type III.

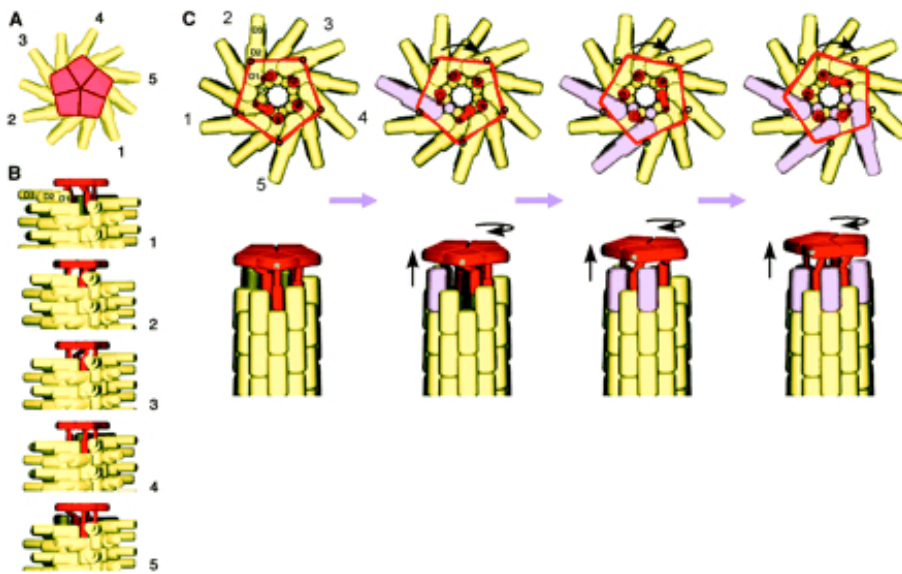


FIG. 6.5 – *Modèle proposé pour l'addition des monomères de flagelline.* HAP2 forme une coiffe pentamérique à l'extrémité distale du filament, qui garantit un espace qui sert de chambre de repliement pour une molécule de flagelline isolée et empêche la fuite des monomères avant leur polymérisation. La rotation de la coiffe permet l'addition des monomères séparément à l'extrémité distale du filament. (d'après YONEKURA et al., 2000 [Yon2000]).

Un modèle de polymérisation des sous-unités de flagelline à l'extrémité distale du flagelle a été proposé par NAMBA et son équipe [Yon2000] (figure 6.5).

Lors de l'addition de chaque molécule de flagelline la coiffe est déplacée de 4,7 Å vers le haut et subit une rotation de 6,5°.

Ainsi, une rotation d'un tour de la coiffe permet l'addition de $\frac{360}{6,5} \approx 55$ sous-unités. De cette façon, l'énergie nécessaire à la polymérisation du flagelle serait relativement faible, ce mécanisme impliquant un grand nombre de petits déplacements.

6.3 Conclusions sur le flagelle

Le flagelle est un système de référence pour l'étude du T3SS. Les paramètres hélicoïdaux sont de plus semblables à ceux de l'aiguille de type III avec 5.5 résidus par tour d'hélice alors que la différence de largeur des fibres (120-150 Å pour le flagelle et 50-80 Å pour l'aiguille de sécrétion de type III) vient probablement de la différence de taille des monomères constitutifs des 2 structures.

Etudiée depuis plus longtemps, la structure entière de la flagelline, sous-unité du flagelle, est connue, ainsi qu'une description de l'assemblage à une résolution de 4 Å. La polymérisation se fait par l'intermédiaire de contacts hydrophobes entre les extrémités N-terminale et C-terminale de la flagelline.

L'addition des sous-unités du filament intervient à l'extrémité distale du filament en cours de polymérisation. Les monomères de flagelline peuvent se replier un par un, protégés par une chambre de repliement. La coiffe à l'extrémité du filament leur permet de s'ajouter correctement au filament en cours d'assemblage.

Troisième partie

Matériel et méthodes

Chapitre 7

Techniques de biologie moléculaire et biochimie

7.1 Biologie moléculaire

7.1.1 Clonage

pscEFGHI, une partie de l'opéron *exsD-pscEFGHIJKL*, a été amplifiée grâce à une procédure standard d'amplification par PCR ("Polymerase Chain Reaction") à partir de l'ADN génomique de la souche CHA de *P. aeruginosa* et clonée dans un vecteur pCR 2.1-TOPO[®] (Invitrogen). PscE dans la souche CHA contient 2 mutations par rapport à sa séquence dans la souche PAO1 (disponible sur www.pseudomonas.com) : C40G et H43R [Sto2000]. A partir de cette construction pCR 2.1-TOPO[®]-*pscEFGHI*, différents cycles de PCR ont été effectués pour cloner les gènes *pscE*, *pscF* et *pscG*, seuls ou en combinaison, dans des plasmides d'expression : pET-15b (Novagen) qui possède une séquence codante pour une étiquette histidine en N-terminal puis un site de reconnaissance à la thrombine dans le cas de *pscE*, *pscG* et *pscEFGHI*, et pET-22b (Novagen), qui possède une séquence codante pour une étiquette histidine non clivable en C-terminal, pour *pscF*.

Des cellules *E. coli* BL21(DE3) ont ensuite été transformées par les plasmides construits pour l'expression des protéines.

7.1.2 Mutagenèse dirigée

Les mutations ponctuelles ont été réalisées grâce au kit de mutagenèse dirigée "Quick Change mutagenesis kit" (Stratagene, La Jolla, CA) en utilisant 50 μ L de réaction contenant les réactifs ci-dessous :

- 30-50 ng de matrice d'ADN,
- 125 ng de chaque amorce nucléotidique,
- 10 mM dNTP,
- le tampon de la réaction,
- 2,5 unités de polymérase Pfu Ultra II (Stratagène).

Les séquences des amorces sont fournies en annexes (Annexe A, p.215).

Les 50 μ L de la réaction sont placés dans une machine à PCR (thermocycleur) et la mutagenèse est effectuée selon le programme suivant, répété n fois (n=12 pour une mutation ponctuelle, n=16 pour une modification d'un acide aminé et n=18 pour la délétion ou l'insertion de plusieurs acides aminés) :

- 95°C pendant 30 secondes,
- 95°C pendant 1 minute,
- 55°C pendant 1 minute,
- 68°C pendant 1 minute \times nb kb du plasmide.

L'ADN parental non muté a été synthétisé chez *E. coli*, il est méthylé, contrairement à l'ADN muté synthétisé *in vitro*. Afin de sélectionner l'ADN muté, les produits de la réaction sont digérés pendant 1 heure à 37°C avec 10 unités de l'enzyme de restriction DpnI qui clive spécifiquement les sites méthylés.

Après transformation des cellules compétentes d'*E. coli* (JM109 ou Top10) par le produit de la réaction, les clones obtenus sont dans un premier temps sélectionnés par digestion avec les enzymes de restriction qui correspondent au site de clonage du gène d'intérêt.

Les clones positifs à la présence du gène d'intérêt sont alors séquencés afin de vérifier la présence de la mutation.

7.2 Biochimie

7.2.1 Croissance cellulaire et surexpression de la protéine d'intérêt

Les protéines PscE, PscF et ses mutants, PscG ainsi que les complexes protéiques PscE:PscF:PscG et PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG ont été exprimés et purifiés selon le protocole suivant.

Une culture est préparée en diluant au 1/30ème une préculture à saturation dans le milieu TB (Terrific Broth) supplémenté de 100 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicilline (Euromedex). Les cellules sont laissées à 37°C sous agitation (220 rpm) jusqu'à ce qu'elles atteignent une $\text{DO}_{600nm} \approx 0,8$ U.A. L'expression de la protéine est alors induite par l'ajout d'1 mM IPTG (Euromedex).

Après 3 heures d'expression à 37°C, les cellules sont centrifugées à 5500 g pendant 15 minutes, les culots bactériens obtenus sont resuspendus à 4°C dans le tampon de lyse (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 2% glycérol et 1 tablette d'inhibiteurs de protéase sans EDTA (Complete[®] EDTA-free, Roche)). Les cellules sont alors lysées par sonication (2 minutes totales de sonication par pulses de 2 secondes espacées de 10 secondes). Le lysat obtenu est centrifugé 30 minutes à 39200 g afin de séparer les protéines solubles du matériel insoluble.

7.2.2 Etapes de purification

Chromatographie d'affinité sur colonne Nickel-Sépharose

Le surnageant contenant les protéines solubles est alors chargé sur une colonne d'affinité Chelating Sépharose (Amersham Pharmacia Biotech) de 1-5 mL préalablement chargée en Ni^{2+} et équilibrée dans le tampon A (25 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.2 M NaCl, 2% glycérol, 20 mM imidazole). Dans le cas de la purification des complexes ternaires PscE:PscF:PscG ou PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG, le tampon A ne contient pas d'imidazole car le complexe d'intérêt est élué dès 20 mM d'imidazole. La colonne est ensuite lavée avec une solution de (1.5 M KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.2), afin d'éliminer l'ADN résiduel, puis lavée avec l'équivalent de 10 volumes de colonne de tampon A. Les protéines sont enfin éluées par un gradient linéaire de 20 à 500 mM d'imidazole. L'imidazole permet de détacher les étiquettes histidine

des ions Ni^{2+} fixés sur la résine par compétition avec ces derniers.

Les fractions sont ensuite analysées par SDS-PAGE.

Chromatographie par exclusion de taille

Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont alors chargées sur une colonne d'exclusion Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech) préalablement équilibrée dans le tampon (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA). Dans le cas de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG, le pH utilisé pour l'élution est de 6.8.

Coupure de l'étiquette hexahistidine

L'étiquette histidine est clivable grâce au site de reconnaissance à la thrombine (LVPRGS) situé entre le His₆ et la protéine d'intérêt.

Des tests de coupure à petite échelle sont réalisés au préalable à température ambiante afin de déterminer les conditions de coupure optimales en terme de rapport enzyme/protéine (1:500 et 1:1000) et de temps d'incubation (30 minutes à 7 heures). Les échantillons provenant des différentes conditions de coupure sont alors analysés sur gel SDS-Page et la meilleure condition (qui correspond à une coupure complète) est appliquée à grande échelle sur la protéine purifiée. Typiquement, dans le cas de PscE ou PscF, l'étiquette histidine est coupée après 45 minutes d'incubation avec un rapport 1:1000. Pour PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG, il est nécessaire d'incuber la protéine avec la thrombine selon un rapport 1:500 pendant 7 à 10 heures.

Dans le cas de PscE:PscF:PscG, l'étiquette histidine n'a pas pu être clivée.

Dans tous les cas, lorsque la coupure est terminée, l'enzyme est inhibée par l'ajout de 1mM de PMSF (Sigma).

Le produit de la réaction est alors analysé par SDS-PAGE et spectrométrie de masse dénaturante.

L'échantillon clivé est à nouveau chargé sur une colonne d'exclusion de taille afin d'enlever les fragments d'étiquettes histidine résiduels. 10 mM DTT sont additionnés au tampon afin de réduire les cystéines libres de PscE et PscG.

La pureté des fractions est alors analysée par SDS-Page et spectrométrie de masse.

Chapitre 8

Analyses biophysiques

8.1 Séquençage N-terminal

L'identification de la séquence d'acides aminés à l'extrémité N-terminale des protéines étudiées dans cette thèse a été effectuée selon le principe de la dégradation d'Edman, réalisée sur un séquenceur en phase gazeuse modèle 492 (Applied Biosystems). C'est un processus cyclique par lequel les acides aminés sont clivés un par un à partir du N-ter de la protéine, et identifiés par HPLC comme dérivés de phenylthiohydantoïne.

Ce séquençage a été réalisé au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (LEM) à l'IBS par Jean-Pierre Andrieu.

Cette technique permet d'analyser des échantillons en solution ou de séquencer des protéines préalablement fixées sur une membrane. Nous avons choisi cette dernière méthode puisque nos échantillons contiennent plusieurs protéines différentes, qui ont de cette manière été analysées séparément.

Pour cela, 30 μ g de protéines (complexe ternaire ou produits de la protéolyse) sont d'abord séparés par un gel dénaturant de tricine à 15% d'acrylamide. Le gel est ensuite lavé dans 10 mM CAPS pH 11, 10% méthanol. La membrane PVDF ProBlott (TM) (Applied Biosystems), préalablement lavée dans le méthanol, est trempée dans ce même tampon et déposée sur le gel d'acrylamide. Les protéines sont alors transférées du gel vers la membrane après application d'une tension de 100 V pendant 1h30 à l'aide d'un appareil de Western Blot. La membrane est ensuite colorée par du bleu de Coomassie dans 50% méthanol, 1% acide acétique

pendant 5 minutes puis décolorée dans 50% méthanol pendant 2 fois 10 minutes. Les bandes correspondant aux protéines sont découpées et soumises au séquençage N-terminal comme décrit précédemment.

Ceci a permis d'identifier les trois partenaires du complexe PscE:PscF:PscG et les fragments protéolytiques suite à la protéolyse ménagée effectuée sur le complexe ternaire.

8.2 Pontage chimique

Afin d'identifier des états oligomériques de PscF, nous avons réalisé des expériences de pontage chimique sur l'échantillon de PscF purifié en utilisant l'agent de pontage EGS qui lie covalamment les lysines libres distantes de 16 Å environ [Ye2004]. Si ces lysines appartiennent à des protéines différentes celles-ci migrent donc sur gel SDS-PAGE comme une seule molécule d'une taille correspondant à un état d'oligomérisation plus élevé que le monomère. La réaction de pontage peut cependant ne pas être totale, il en résulte plusieurs états d'oligomérisation visibles simultanément. Une fibre se caractérise par cette technique par l'obtention de bandes de très hauts poids moléculaire ainsi que des bandes d'états oligomériques inférieurs.

Lors de cette étude l'échantillon ne doit pas contenir de molécules de Tris (qui font partie du tampon de l'échantillon protéique purifié). En effet, les amines libres du Tris réagiraient avec l'EGS et satureraient les groupements réactionnels. Pour cela, l'échantillon est préalablement dialysé contre 25 mM Hepes pH 7.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA afin d'éliminer les molécules de Tris présentes dans le tampon de l'échantillon. La protéine dialysée est ensuite incubée avec l'EGS (dissous dans le DMSO) à des concentrations finales en EGS de 0.5 mM, 2 mM et 4 mM à température ambiante pendant 1 heure. La réaction est arrêtée en ajoutant du Tris-HCl pH 8.0 à une concentration finale de 50 mM. Les échantillons sont alors analysés par SDS-PAGE.

8.3 Spectrométrie de masse

8.3.1 Principe

La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet de mesurer le rapport masse/charge d'ions isolés en phase gazeuse, et ainsi de mesurer la masse de protéines ou de peptides. A l'IBS, elle est réalisée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP).

Un spectromètre de masse est constitué de 3 parties distinctes : une source d'ionisation qui assure la production des ions en phase gazeuse, un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge et un détecteur qui transforme le courant ionique en un signal mesurable. Les sources d'ionisation MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation) et ESI (ElectroSpray Ionisation) sont les plus couramment employées en biologie. Elles sont décrites dans les paragraphes suivants.

Après l'ionisation, les ions sont ensuite dirigés *via* l'interface au moyen de gradients de tension vers l'analyseur de masse où règne un vide poussé.

Dans le cas des détecteurs TOF (Time Of Flight), les ions sont ensuite séparés en fonction du temps qu'il mettent à atteindre le détecteur. Ceci permet de dresser la distribution masse/charge de l'échantillon. Le principe de l'analyseur TOF est basé sur l'écart de temps de vol entre des ions de rapport m/z distinct mais d'énergie cinétique similaire (fixé par le potentiel qui permet son accélération au niveau de la source). Le temps nécessaire pour que l'ion atteigne le détecteur est ainsi uniquement dépendant de m/z . Plus m/z sera petit, plus la vitesse de l'ion sera grande, et inversement.

8.3.2 Ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)

L'analyte à faible concentration (environ $1 \mu\text{M}$) est mélangé avec une matrice d'acide sinapinique (dans le cas de protéines) et déposé sur une plaque métallique. Celle-ci est placée dans le spectromètre. Sous l'effet des pulses du faisceau laser, la matrice et l'analyte qu'elle contient sont ionisés, et des ions de macromolécules sont alors formés. Ces derniers sont ensuite analysés par mesure de temps de vol selon le principe décrit précédemment.

Cette méthode a permis d'analyser les produits de la protéolyse limitée réalisée sur le complexe ternaire PscE:PscF:PscG ainsi que les produits de purification de protéines.

8.3.3 Ionisation electrospray

L'échantillon, dans un solvant volatil polaire, est introduit dans une source à pression atmosphérique au moyen d'un capillaire à l'extrémité duquel est appliquée un potentiel de 3 à 4 kV. Sous l'effet du fort champ électrique généré, l'échantillon est volatilisé en un nuage de gouttes chargées dans un flux d'azote chaud, qui facilite la désolvatation des espèces chargées. Au fur et à mesure de l'évaporation du solvant, la taille des gouttelettes diminue et leur densité de charge augmente. Lorsque les répulsions électrostatiques atteignent la tension superficielle de la gouttelette, cette dernière explose pour donner des gouttelettes plus petites. Ce processus est réitéré jusqu'au passage des espèces chargées en phase gazeuse [Bri2005].

Dans le cadre de la spectrométrie électrospray, les échantillons protéiques sont tout d'abord dilués à 1 μ M dans une solution eau/acétonitrile ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0,2% HCOOH) avec un rapport volume/volume 1/1 afin de les dénaturer. Ils sont alors injectés à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ sous une tension de capillaire de 3 kV.

8.3.4 Spectrométrie de masse native

De la spectrométrie de masse électrospray en conditions natives a été effectuée par David Lemaire afin de résoudre la stœchiométrie du complexe ternaire.

Pour cela, l'échantillon protéique à une concentration de 20 μM est préalablement dialysé dans 20 mM bicarbonate d'ammonium pH 7.2 en 3 bains de dialyse successifs afin d'éliminer les sels non volatils présent dans l'échantillon.

L'échantillon est ensuite injecté à un débit de 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ sous une tension de 3 kV au niveau du capillaire et de 150 V et 7 V au niveau des cônes d'échantillonnage et d'extraction respectivement. Les spectres sont enregistrés en mode positif pour des rapports masse/charge compris entre 2000 et 6100 m/z. La calibration est effectuée par rapport à une solution de CsI à 0.5 mg/mL dans un rapport volume/volume 1/1 d'eau/alcool isopropyl. Les données sont traitées avec le logiciel MassLynx 4.0 (Micromass).

8.4 Diffusion dynamique de lumière (DLS)

Une étude de la diffusion dynamique de lumière par l'échantillon protéique pur est réalisée préalablement aux essais de cristallisation, ceci afin de vérifier l'homogénéité en terme de taille des particules de l'échantillon.

Sous l'effet du mouvement brownien et à température constante, plus les molécules sont petites plus elles se déplacent rapidement. La diffusion dynamique de la lumière permet de mesurer le coefficient de diffusion des particules dont le diamètre varie de quelques nanomètres à quelques micromètres.

Lors de la mesure, un faisceau de lumière cohérente (ici un laser) interagit avec les particules en mouvement qui diffusent de façon incohérente, et émettent donc un rayonnement à une fréquence différente de la fréquence d'émission. C'est le décalage entre les fréquences émises et diffusées qui est mesuré, et il est plus important dans le cas des petites particules, qui sont animées d'une vitesse plus grande, que dans le cas de particules plus grosses. Le décalage fréquentiel mesuré peut ainsi être relié à la taille de la particule qui a diffusé l'onde.

En considérant les particules globulaires, leur poids moléculaire peut être estimé d'après le rayon hydrodynamique grâce à la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B \times T}{6\pi \times \eta \times r_h} \quad (8.1)$$

où D est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), η est la viscosité (Pa.s), k_B la constante de Boltzmann ($1k_B=1.99 \text{ cal.mole}^{-1}.\text{K}$), T la température absolue (K) et r_h le rayon hydrodynamique caractéristique de l'objet diffusant (m).

D'après ces données, la distribution de taille des particules de l'échantillon et leur rayon hydrodynamique peut être déterminé, ce qui renseigne sur l'homogénéité de l'échantillon ainsi que sur l'état d'oligomérisation éventuel des molécules. La dispersité est en particulier calculée, elle correspond à la déviation standard de leur taille rapportée à leur rayon hydrodynamique moyen. Si cette valeur est inférieure à 20%, l'échantillon est considéré comme monodisperse, caractéristique encourageante pour initier des essais de cristallogenèse.

Cette méthode de mesure est très sensible aux éventuels agrégats et à la concentration de l'échantillon ; celui-ci est préalablement centrifugé à 152000 g dans une ultracentrifugeuse et sa concentration est ajustée à $100\mu\text{M}$ environ dans le cas des protéines étudiées dans cette thèse.

Un appareil de diffusion dynamique de lumière DynaPro est utilisé au laboratoire, et les données sont analysées par le programme Dynamics.

8.5 Spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD)

8.5.1 Principe

Les macromolécules biologiques possèdent toutes des carbones asymétriques, elles sont chirales. Dans la nature les protéines sont toutes lévogyres et cette propriété leur confère une activité optique lorsqu'elles interagissent avec de la lumière polarisée circulairement [Jan1994].

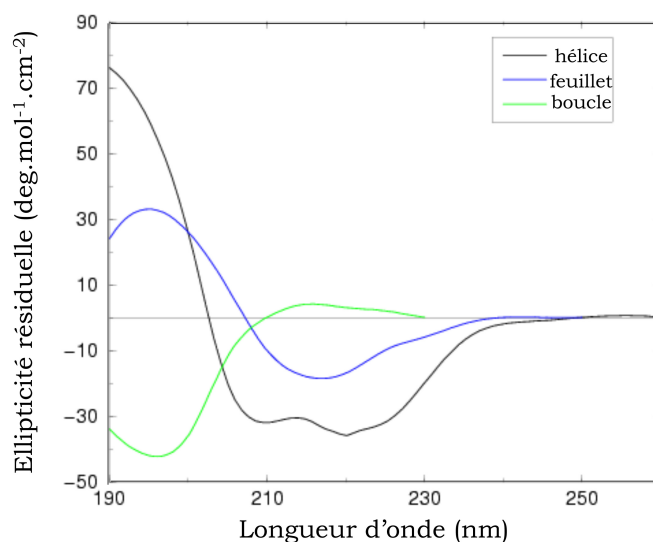


FIG. 8.1 – *Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques de l'organisation en structure secondaire d'une protéine.* (a) Le spectre correspondant à un repliement en hélices α (noir) présente 2 minima à 208 et 222 nm. (b) Le spectre correspondant à un repliement en feuillet β (bleu) présente 1 minimum vers 210-212 nm. (c) Spectre correspondant à une protéine mal repliée (vert). Image extraite de www.besley.chem.nottingham.ac.uk/research/research-proteincd..html.

La spectroscopie de dichroïsme circulaire permet d'obtenir une information sur la structure secondaire des protéines. En effet, des repliements en hélices α , en

feuillets β ou en boucles donnent lieu à des spectres très différents dans l'UV lointain (figure 8.1). Deux minima à 208 et 222 nm sont en outre caractéristiques d'une organisation en hélices α , alors qu'un minimum unique vers 210 nm est la signature des feuillets β . Le spectre observé pour une protéine est une combinaison linéaire de ces différentes composantes selon la proportion de la protéine repliée en hélices α , en feuillets β ou en boucles. Dès lors, il est à noter que le dichroïsme circulaire est beaucoup plus sensible à une organisation en hélices α ; leur contribution est susceptible de masquer des contributions venant d'autres éléments de structure secondaire.

Cette technique permet également de suivre l'évolution de la structure secondaire, lors d'une expérience de dénaturation par exemple, et ainsi de mesurer la stabilité de la protéine.

Le dichroïsme circulaire est un effet de l'activité optique qui ne dépend pas de l'orientation des molécules, la mesure peut donc se faire en solution. De plus, cette technique est rapide et requiert peu d'échantillon (200 μL à 0.2 mg/mL). L'échantillon à l'intérieur d'une cuvette en quartz QS (Ellma) est placé dans un faisceau de lumière polarisée droite et gauche alternativement. Il est alors possible d'observer une différence ΔA entre l'amplitude des ondes polarisées gauches et droites, diffusées par l'échantillon (A_G et A_D respectivement) :

$$\Delta A = A_G - A_D \quad (8.2)$$

Généralement, cette différence d'absorbance ΔA est très faible. Elle est de moins de 1% de l'amplitude de l'onde électromagnétique dans l'UV lointain, domaine de longueur d'onde dans lequel on se place pour étudier la structure secondaire des protéines. Les instruments de mesure doivent donc être extrêmement précis, et la préparation des échantillons très soignée.

En notant l le trajet optique (largeur de la cuve, en cm) et C la concentration de la protéine (en mol/L), on peut écrire

$$\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D = \frac{\Delta A}{l \times C} \quad (\text{loi de Beer-Lambert}) \quad (8.3)$$

8.5.2 Acquisition des données

La protéine purifiée est dans le tampon 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1mM EDTA. Or aux longueurs d'onde utilisées (en dessous de 200 nm), l'absor-

bance du Tris est importante, ce qui perturbe l'expérience. L'échantillon est donc préalablement placé dans le tampon 25 mM Phosphate de sodium pH 7.2, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, à une concentration d'environ 50 μ M. L'échange de tampon est réalisé sur colonne de filtration sur gel afin d'éviter toute précipitation lors d'une dialyse.

La cuvette utilisée est en quartz QS (Ellma) ; elle est transparente aux ondes électromagnétiques de longueurs d'ondes utilisées (190-250 nm).

Les spectres ont été acquis sur un spectropolarimètre JASCO-810 muni d'un contrôleur de température de type Peltier à 22°C dans une cuvette de trajet optique d'1 mm.

L'ellipticité est mesurée pour une longueur d'onde incidente comprise entre 250 et 190 nm avec le tampon seul, puis avec la protéine. Le spectre caractéristique de la protéine est alors obtenu en soustrayant la composante due au tampon des valeurs expérimentales correspondant à la protéine dans son tampon. L'ellipticité $[\Theta]$, mesurée par le spectropolarimètre, s'écrit

$$[\Theta] = 3300 \times \Delta\epsilon \quad (8.4)$$

L'ellipticité molaire résiduelle, qui est reportée sur les courbes de dénaturation, est alors calculée selon la relation

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{[\Theta] \times 100 \times M_r}{c \times d \times N} \quad (8.5)$$

Avec $[\Theta]$: ellipticité mesurée (en degrés), M_r : poids moléculaire de la protéine (en Daltons), c : concentration de la protéine (en mg/mL), d : largeur de la cuve (en cm) et N : nombre de résidus par protéine. $[\Theta]$ et $[\Theta]_{MRW}$ sont donc homogènes à des degrés \times cm² \times dmol⁻¹.

Toutes les protéines étudiées dans cette thèse ont un spectre caractéristique d'un repliement en hélices α , ce qui a été confirmé par la structure cristallographique du complexe ternaire PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG.

La stabilité thermodynamique a ensuite été mesurée en se plaçant à 222 nm afin d'avoir un maximum de signal, pour des températures comprises entre 4 et 96°C. La température de la cuve est ainsi accrue par paliers d'1°C par minute, la valeur de l'ellipticité est mesurée après une période de stabilisation de 10 secondes.

Les spectres ont été acquis pour des températures croissantes puis décroissantes afin de mettre en évidence le phénomène de repliement qui intervient chez toutes

les protéines étudiées dans cette thèse lorsque la température est abaissée après avoir été augmentée.

Le spectre correspondant au tampon seul a été soustrait de celui correspondant à la protéine dans son tampon afin de s'affranchir des variations d'ellipticité dues à ce dernier. Enfin, pour faciliter leur visualisation, l'ellipticité résiduelle des différentes courbes a été ajustée de sorte que toutes soient égales à 4°C.

8.5.3 Interprétation des résultats

Le spectre de CD est indicatif du type de repliement en structure secondaire de la protéine étudiée (décrit précédemment dans le paragraphe Principes).

La température de fusion de la protéine peut se calculer selon la méthode ci-dessous :

A partir de la courbe de dénaturation thermique, il est possible de calculer la constante d'équilibre $K(T)$ selon l'équation :

$$K(T) = \frac{f_U}{f_F} = \frac{(y_F - y)}{(y - y_U)} \quad (8.6)$$

où f_U et f_F sont les fractions de la protéine dépliée et repliée respectivement ($f_U + f_F = 1$), y_U et y_F les valeurs d'ellipticité correspondantes aux états déplié et replié respectivement. Pour chaque valeur de la température, l'ellipticité mesurée (y) est alors considérée comme une combinaison linéaire de la valeur de l'ellipticité lorsque la protéine est complètement repliée (y_F) et lorsqu'elle est complètement dépliée (y_U) : $y = y_F f_F + y_U f_U$

A l'équilibre, la variation d'énergie libre se calcule selon

$$\Delta G(T) = -RT \ln(K(T)), \quad (8.7)$$

où R est la constante des gaz parfaits ($R = 8,3144 \text{ J. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) et T la température absolue (en K).

La détermination de la courbe $\Delta G(T)$ permet alors de déterminer graphiquement la température de fusion ; elle est telle que $\Delta G(T_m) = 0$.

8.6 Microscopie électronique

8.6.1 Principe

Tout comme le microscope optique utilise un faisceau de photons déviés ou focalisés par des lentilles optiques, le microscope électronique en transmission utilise un faisceau d'électrons, qui est dévié ou focalisé par un jeu de lentilles magnétiques. Selon la densité, l'épaisseur ou la nature chimique de l'échantillon, les électrons sont plus ou moins absorbés par l'échantillon ; sa surface est donc plus ou moins irradiée, et c'est ce qui est observé en plaçant le détecteur dans le plan focal image.

8.6.2 Mise en oeuvre expérimentale

Les échantillons protéiques à une concentration de 0,15 mg/mL sont adsorbés à l'interface carbone/mica et colorés négativement avec 1% d'acide phosphotungstique (SST) ou 1% d'acetate d'uranyle, qui se fixe préférentiellement au bord des molécules adsorbées. Une grille est ensuite placée sur le film de carbone et laissée à l'air libre quelques minutes pour sécher. Les micrographes sont enregistrés à faible dose avec un microscope Philips CM12 à 120 kV et avec un grossissement de 45000 \times . Le colorant a un haut poids moléculaire et dévie les électrons ; les molécules de protéine autour apparaissent en blanc sur fond noir, d'où le nom de coloration négative.

8.7 Spectrométrie RMN 1D

Dans ce paragraphe, seules l'acquisition d'un spectre RMN 1D et l'interprétation de ce spectre seront exposées. La spectroscopie RMN n'étant pas le sujet de cette thèse, la théorie la concernant ne sera pas abordée.

Lors de l'expérience de RMN 1D, l'échantillon protéique en solution (400 μ L à 50 μ M environ) est introduit dans le spectromètre où règne un champ magnétique B_0 statique très fort et homogène. Au laboratoire de RMN de l'IBS (LRMN) les spectromètres utilisés génèrent des champs magnétiques de 14 et 18,8 T (ce qui correspond à des fréquences de 600 et 800 MHz pour les protons). Un champ magnétique B_1 variable et d'amplitude beaucoup plus faible lui est additionné par impulsions pendant l'expérience.

Ce sont les spins $1/2$ (principalement les spins des protons des protéines) qui interagissent avec B_1 ; ils entrent en résonance avec le champ oscillant et oscillent à leur fréquence de Larmor ν_L , proportionnelle au champ magnétique local "vu" par le spin considéré, et qui dépend de l'environnement chimique du noyau. Les variations de la fréquence de Larmor, bien que très faibles, sont mesurables et ce sont elles qui sont représentées sur les spectres de RMN. Leur analyse permet de recueillir des informations sur la structure de la protéine [Jan1994].

Cette résonance est suivie d'un retour à l'équilibre ; c'est la relaxation qui est d'autant plus rapide que les molécules sont grosses. La vitesse de relaxation influe sur la largeur des bandes des spectres de RMN ; plus la protéine relaxe rapidement plus les bandes sont larges et le spectre peu résolutif. L'observation de la largeur des bandes donne donc accès à une information sur l'état d'oligomérisation éventuel de la protéine étudiée (figure 8.2-a).

Les déplacements chimiques δ des spins des protons de la protéine sont liés à la fréquence de Larmor selon la relation

$$\delta(ppm) = \frac{\nu_L - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \quad (8.8)$$

où ν_L est la fréquence de Larmor mesurée et ν_{ref} la fréquence de référence du Tétraméthylsilane (TMS, $(CH_3)_4Si$), dont les protons sont complètement déblindés. Ce sont les valeurs des déplacements chimiques qui sont reportées sur les spectres RMN.

Le spectre RMN-1D du proton d'une protéine repliée s'étend sur environ 15 ppm alors que pour une protéine mal repliée les pics sont moins dispersés (figure 8.2-b,c).

Typiquement, les protons des groupes méthyles (CH_3) ou méthylènes (CH_2) résonnent à fort champ, pour des valeurs de déplacement chimique comprises entre 0 et 4 ppm. Les protons NH résonnent eux à des champs plus faibles, entre 6,5 et 9,5 ppm. Leur détection peut être empêchée par la deutération de l'échantillon, en effet ces protons peuvent s'échanger avec le deutérium du solvant. Ces protons sont en outre stabilisés par des liaisons hydrogènes impliquées dans la structure secondaire en hélices α ou en feuillets β . L'observation de l'échange hydrogène/deutérium (échange H/D) éventuel renseigne donc sur l'organisation en structure secondaire de la protéine étudiée : la persistance des pics caractéristiques de ces protons après l'ajout de D_2O signifie que ceux-ci sont impliqués dans les

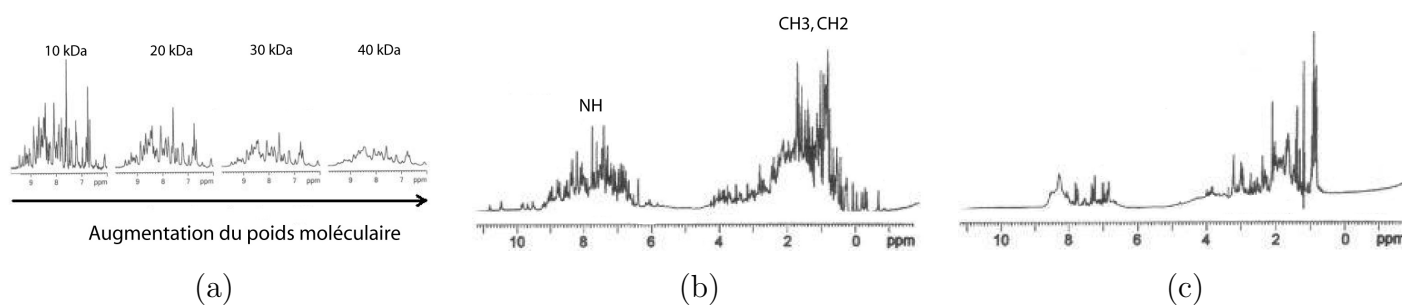


FIG. 8.2 – **Analyse de spectres de RMN-1D.** (a) Baisse de résolution des pics et donc de la qualité du spectre lorsque le poids moléculaire de la protéine augmente. (b) Dans le cas d'une protéine bien repliée, les pics sont bien dispersés dans la région des méthyls et des NH. (c) Dans le cas d'une protéine mal repliée, les pics sont mal dispersés. Images extraites de www.ibs.fr/content/ibs/presentation/Platform/Facilities/nmr_1d.htm.

liaisons hydrogènes qui stabilisent les éléments de structure secondaire, et donc que la protéine est au moins partiellement repliée.

Chapitre 9

Méthodes de microbiologie et biologie cellulaire

Les études dont les protocoles seront décrits dans ce chapitre ont été réalisées par le groupe d'Ina ATTRÉE (iRTSV).

9.1 Test de cytotoxicité

Ce test permet de montrer si *P. aeruginosa*, modifiée ou non, a gardé un phénotype infectieux envers des macrophages. Au laboratoire d'Ina ATTRÉE (iRTSV), c'est la lignée cellulaire de macrophages J774 qui est utilisée. Ces expériences ont été effectuées en partenariat avec Sophie PLÉ, post-doctorante dans le laboratoire d'Ina ATTRÉE.

9.1.1 Préparation de *P. aeruginosa* et des macrophages

Les précultures de *P. aeruginosa* dans LB sont diluées afin d'obtenir une $DO_{600nm}=0.2$ U.A. dans 3 mL de LB. Les cellules sont laissées à 37 ° C, 220 rpm jusqu'à une $DO_{600nm} \approx 1$ U.A., ce qui correspond à environ 6.10^8 bactéries/mL.

Toutes les manipulations sur les macrophages se font dans un environnement stérile (sous la hotte), dans une pièce éloignée de celle des cultures bactériennes. La veille, environ 3.10^5 macrophages sont déposés par puits dans une boîte de 96 puits dans un volume final de 300 μ L de DMEM (Gibco), supplémenté avec 10%

de sérum de boeuf foetal inactivé (Gibco). Ils adhèrent au fond des puits et sont laissés sur la nuit dans un incubateur à 37 ° C, 5% CO₂ . 3 heures avant l'infection, les macrophages sont lavés 2 fois : les 300 µL de DMEM sont aspirés soigneusement et 300 µL de DMEM préalablement chauffé à 37 ° C sont remis dans chaque puits. Les macrophages sont ensuite replacés dans l'incubateur à 37 ° C, 5% CO₂ pendant 3 heures.

9.1.2 Infection

Les macrophages sont infectés avec une MOI ("Multiplicity Of Infection" : multiplicité d'infection) de 5 à 10 (soit 5 à 10 bactéries par macrophage). Afin de servir de témoin, un puits non infecté servira de blanc et permettra de mesurer le bruit de fond (mort naturelle des macrophages). Dans un autre puits, 300 µL de 2% Triton X-100 est déposé, détergent qui conduit à la lyse complète des macrophages.

Les macrophages infectés sont remis à l'incubateur à 37 ° C, 5%CO₂ pendant 3 heures. Suite à cela, 30 µL de la solution de chaque puits sont prélevés et déposés dans une autre boîte 96 puits, à l'exception de la condition avec le Triton 2% où 60 µL sont prélevés.

9.1.3 Révélation

La cytotoxicité est évaluée en mesurant l'activité de la Lactate Deshydrogénase (LDH), enzyme cytoplasmique soluble des macrophages qui est relarguée dans le milieu en cas de lyse des macrophages, grâce au kit de cytotoxicité (Cytotoxicity Detection Kit, Roche[®]). Après avoir laissé les réactifs agir 2 minutes à l'obscurité, les solutions de puits se colorent en rouge plus ou moins intense, et l'absorbance à 480 nm est lue par un lecteur de micro-plaques, avec le programme BL4 (Biolyse 4).

L'absorbance lue pour la souche cytotoxique (souche sauvage CHA) correspond à une cytotoxicité de 100%, et les autres valeurs de cytotoxicité sont calculées par proportionnalité.

9.2 Lavage d'aiguilles chez *P. aeruginosa*

Dans un premier temps, les bactéries sont cultivées dans des conditions inductrices pour le T3SS. Pour cela, à 30 mL de LB, 5 mM d'EGTA est ajouté, puis 20 mM de MgCl_2 , sous agitation. Enfin les précultures de *P. aeruginosa* dans LB sont diluées dans le LB supplémenté de l'EGTA et du MgCl_2 afin d'obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,1$ U.A. Les cellules sont laissées à 37 ° C, 220 rpm jusqu'à une $\text{DO}_{600} \approx 1$ U.A.

Les cellules sont alors centrifugées à 8000 rpm pendant 10 minutes à 4 ° C. Le surnageant est prélevé délicatement alors que les culots bactériens sont laissés dans la glace.

Le culot bactérien est lavé avec 2 mL de solution contenant (20 mM Tris, 25 mM NaCl et des inhibiteurs de protéases) avant d'être agité doucement sur la glace afin de le resuspendre et en même temps de détacher les aiguilles de la surface des bactéries.

Les culots resuspendus sont alors centrifugés à 5500 g pendant 10 minutes, à 4 ° C.

Le surnageant contient les aiguilles et le culot contient les bactéries lavées.

Le surnageant est centrifugé à 100000 g pendant 30 minutes à 4 ° C. Le culot qui contient les aiguilles est alors resuspendu dans 60 μL de solution de charge Laemmli 1x puis chargé sur gel d'acrylamide dénaturant. La révélation par Western blot permet ensuite la mise en évidence de la présence de PscF dans cette fraction qui contient les aiguilles de *P. aeruginosa* formées lors de la croissance bactérienne dans les conditions inductrices pour le T3SS.

Le culot contenant les bactéries lavées est alors resuspendu dans 600 μL de solution contenant 20 mM Tris, 25 mM NaCl et des inhibiteurs de protéases, puis est soniqué et centrifugé à 40000 g pendant 45 minutes à 4 ° C. Au surnageant, qui contient les protéines cytoplasmiques solubles, est ajouté la solution de charge Laemmli 1x. Il sera chargé sur un gel d'acrylamide dénaturant afin de vérifier l'expression correcte des protéines dans le cytoplasme.

Chapitre 10

Résolution de la structure d'une protéine par cristallographie aux rayons X

10.1 Les rayons X et les cristaux de protéine

Pour sonder la structure de la matière, il est nécessaire d'utiliser un rayonnement de longueur d'onde de l'ordre de grandeur des dimensions caractéristiques de l'objet étudié. Or, les distances interatomiques d'une molécule sont de l'ordre de l'Angström (\AA , 10^{-10} m). Les rayons X, ondes électromagnétiques de longueur d'onde de l'ordre de l'Angström, sont donc propices à l'étude des protéines par cristallographie.

Cependant l'intensité de l'onde diffractée par une seule molécule serait trop faible et ne pourrait pas être mesurée. Afin d'augmenter ce signal, celui-ci est mesuré en faisant diffracter le faisceau de rayons X par un cristal de protéines, de sorte que ces dernières soient ordonnées, que les ondes diffractées soient donc cohérentes et que la somme de leurs intensités soit alors observable.

Entre 30% et 70% du volume d'un cristal de protéines est occupé par le solvant. De plus, les forces impliquées sont des forces locales faibles (liaisons hydrogène, forces électrostatiques, forces de Van der Waals). Les interactions entre macromolécules sont donc faibles.

10.2 Cristallogenèse et description des cristaux

L'objectif de cette section est de décrire les cristaux de protéine utilisés pour la diffraction des rayons X. Après avoir introduit le processus de cristallogenèse nous décrirons brièvement les réseaux cristallins en introduisant les paramètres qui seront utilisés dans les sections suivantes traitant de la résolution d'une structure de protéine par cristallographie.

10.2.1 Cristallogenèse

La cristallogenèse est bien entendu la première étape vers la résolution de la structure d'une protéine, une fois que celle-ci est produite en grande quantité (quelques mg) et pure. Dans cette partie nous étudierons le principe et une technique mises en oeuvre afin d'obtenir ces (magnifiques) cristaux de protéine [Duc1992].

Principe

L'étape de cristallisation est encore peu contrôlée et est conduite de façon largement empirique.

Dans le diagramme de phase d'une protéine (figure 10.1-a), entre la zone de solubilité et la zone de précipitation, figure une étroite bande de sursaturation où la protéine peut cristalliser.

La solubilité d'une protéine dépend de nombreux paramètres comme sa concentration, le pH, la température, la présence d'agents précipitants (notamment le PEG et/ou des sels chaotropiques à haute concentration) ou solubilisants (sels à basse concentration par exemple). L'aspect cinétique est lui aussi important. Le travail de cristallogenèse consiste à modifier ces différents paramètres afin que la protéine cristallise.

La sursaturation, rapport entre la concentration initiale en soluté/protéine et la concentration à l'équilibre, est la force motrice des processus de nucléation et de croissance cristalline.

La première étape de la cristallisation consiste à rendre les protéines insolubles suite à l'ajout d'agents précipitants afin d'amener les protéines dans la partie métastable de la zone de sursaturation où les nuclei ou précipités cristallins se

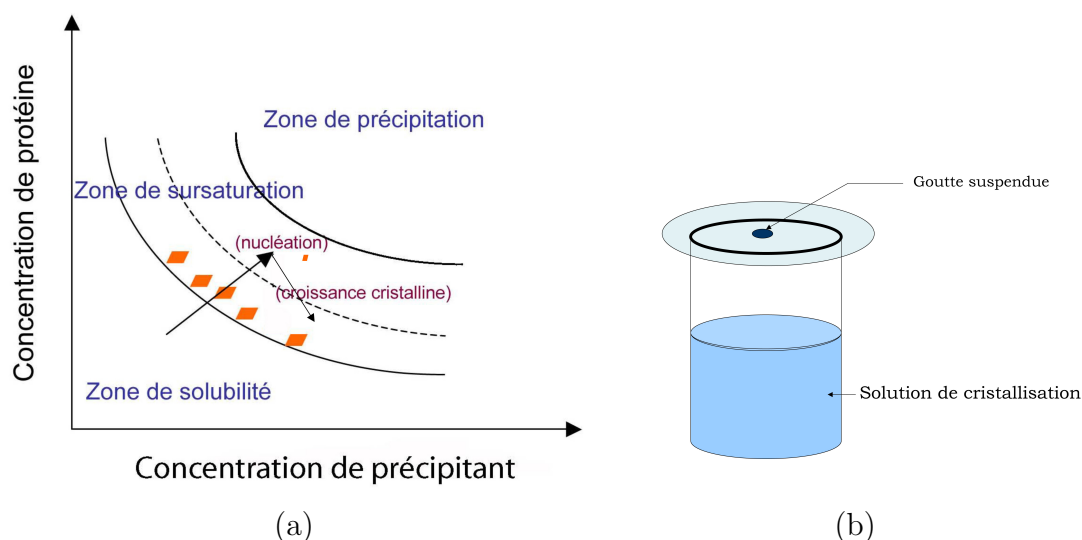


FIG. 10.1 – **Processus de cristallogenèse.** (a) Diagramme de phase décrivant le processus de cristallisation d'une protéine par diffusion de vapeur et (b) mise en oeuvre expérimentale de la technique de diffusion de vapeur par goutte suspendue (b).

forment. Suite à cela la sursaturation des protéines dans le reste de la goutte de cristallisation diminue, ce qui permet de repasser dans le domaine de sursaturation propice à la croissance cristalline. Cette dernière se poursuit alors autour des nuclei formés précédemment et la taille des cristaux augmente, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de protéine disponible dans la goutte ou que la croissance cristalline soit interrompue suite à de trop nombreux défauts de cristallisation (irrégularités dans la maille, addition de molécules légèrement différentes).

Mise en oeuvre

Pour cela, la technique la plus couramment utilisée au laboratoire est la méthode par diffusion de vapeur en goutte suspendue [McP1995, Duc1992]. Elle consiste en la diffusion de vapeur entre une goutte de solution protéique mélangée à la solution de cristallisation et un réservoir de solution de cristallisation qui est un mélange d'agents précipitants et solubilisants, et ce jusqu'à ce que les potentiels chimiques de la goutte et du puits s'équilibrent.

Pour cela, une goutte d'1 μL de solution de protéine est déposée sur une lamelle de verre siliconé et 1 μL de solution de cristallisation du puits lui est ajouté. La

lamelle de verre vient fermer un puits dans lequel 1 mL de solution de réservoir a été déposé, l'étanchéité est assurée par de la graisse de silicone déposée entre la lamelle et le dessus du puits (figure 10.1-b).

Pendant que les potentiels chimiques s'équilibrent, le volume de la goutte suspendue diminue. Il s'en suit une augmentation de la concentration de protéine et de sels dans la goutte, et dans le diagramme des phases la protéine est alors dans le domaine de sursaturation ou de précipitation. C'est là que les germes cristallins apparaissent. Puis le processus de croissance cristalline se poursuit, comme décrit précédemment (figure 10.1-a).

10.2.2 Réseaux cristallins

Un cristal est la répétition périodique d'un motif dans l'espace selon 3 vecteurs non colinéaires $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$ qui engendrent le réseau cristallin. Ces vecteurs définissent la maille du cristal, caractérisée par les normes des vecteurs $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$ et les angles entre eux : α, β, γ [Jan1994].

Parmi les opérations de symétrie de réseau possibles, seules les rotations d'ordre 2, 3, 4 ou 6 sont autorisées pour les cristaux de protéines, éventuellement combinées à des translations selon un vecteur qui est une fraction d'un vecteur du réseau cristallin. En effet les centres d'inversion ou de réflexion selon un plan conduiraient à une modification de la chiralité des acides aminés alors que seuls les acides aminés L sont présents dans les protéines (cette remarque ne s'applique pas aux glycines qui ne sont pas chirales).

L'introduction du concept de réseau réciproque simplifie la présentation de la théorie de la diffraction. Les vecteurs du réseau réciproque $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$ sont construits à partir des vecteurs du réseau direct selon

$$\vec{a}^* = \frac{1}{V} \vec{b} \otimes \vec{c}, \quad \vec{b}^* = \frac{1}{V} \vec{c} \otimes \vec{a}, \quad \vec{c}^* = \frac{1}{V} \vec{a} \otimes \vec{b} \quad (10.1)$$

D'où, dans un repère orthogonal,

$$\vec{a}^* \cdot \vec{a} = \vec{b}^* \cdot \vec{b} = \vec{c}^* \cdot \vec{c} = 1 \quad (10.2)$$

et

$$\vec{a}^* \cdot \vec{b} = \vec{a}^* \cdot \vec{c} = \vec{b}^* \cdot \vec{c} = \vec{b}^* \cdot \vec{a} = \vec{c}^* \cdot \vec{a} = \vec{c}^* \cdot \vec{b} = 0 \quad (10.3)$$

10.3 Diffusion d'une onde plane monochromatique

Une onde monochromatique peut interagir de façon élastique avec un élément de volume δV [Jan1994]. Dans ce cas, le module du vecteur d'onde s est conservé ; il vaut $1/\lambda$ avant et après l'interaction. La direction du vecteur d'onde, elle, change (\vec{s}_0 avant l'interaction et \vec{s}_1 après). La différence de marche entre les ondes diffusées par M et M' peut s'écrire $KM - HM'$, ce qui correspond à une différence de phase (figure 10.2) :

$$\delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda}(KM - HM') = 2\pi(\vec{s}_0 - \vec{s}_1) \cdot \overrightarrow{MM'} \quad (10.4)$$

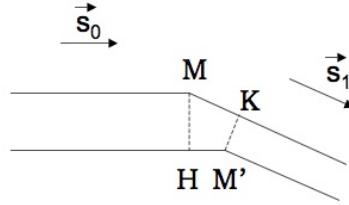


FIG. 10.2 – *Représentation schématique de la modification du vecteur d'onde suite à la diffusion d'une onde par 2 points M et M' .*

En prenant l'origine en O et en notant $\overrightarrow{OM} = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c} = \vec{x}$ et $\vec{s}_0 - \vec{s}_1 = \vec{s}$ (vecteur de diffusion), la phase diffusée par un point M quelconque s'écrit :

$$\phi_M = 2\pi\vec{s} \cdot \vec{x} \quad (10.5)$$

Dès lors on remarque que la phase de l'onde diffusée ne dépend pas de la nature de l'élément diffuseur au point M . Son amplitude néanmoins, elle, en dépend. Ce sont les électrons de la matière qui interagissent avec les ondes électromagnétiques utilisées lors des expériences de radiocristallographie ; les amplitudes des ondes diffusées sont proportionnelles à la densité électronique $\rho(x)$ au point M .

Le facteur de structure F permet de rassembler l'information sur l'amplitude et la phase de l'onde diffusée. Pour un élément de volume δV , il s'écrit

$$dF \propto \rho(\vec{x})e^{2\pi i\vec{s} \cdot \vec{x}} dV \quad (10.6)$$

Le facteur de structure de l'onde diffusée par l'ensemble du volume V s'écrit par intégration

$$F(\vec{s}) = \int_V \rho(\vec{x}) e^{2i\pi\vec{s}\cdot\vec{x}} dV \quad (10.7)$$

L'inversion de cette relation par transformée de Fourier inverse donne accès à la densité électronique $\rho(\vec{x})$ selon

$$\rho(\vec{x}) \propto \int_{V'} F(\vec{s}) e^{-2i\pi\vec{s}\cdot\vec{x}} d(\vec{s}) \quad (10.8)$$

$\rho(\vec{x})$ décrit la position et la nature des atomes de la structure moléculaire recherchée ; sa connaissance permet de reconstruire un modèle de cette structure.

10.4 Diffraction des rayons X par un cristal de protéines

Lorsque l'onde monochromatique interagit avec un objet périodique, la diffusion n'a lieu que dans certaines directions privilégiées. C'est le phénomène de diffraction, qui se produit lorsqu'un cristal de protéines est placé dans un faisceau d'ondes monochromatiques.

La diffraction peut aussi être décrite comme la réflexion de l'onde incidente sur des familles de plans parallèles qui passent par les noeuds du réseau cristallin. Ces plans sont appelés plans réticulaires ; leur équation s'écrit :

$$hx + ky + lz = n \quad (10.9)$$

où (x, y, z) sont les coordonnées des points appartenant au plan, (h, k, l) des entiers appelés indices de Miller de la famille des plans et n un entier qui varie d'un plan à l'autre d'une même famille.

Pour un cristal, et d'après la relation 10.7, on admettra que $F(\vec{s})$ est nul sauf si $\vec{s} \cdot \vec{x}$ est un entier pour tout x, y, z , c'est à dire si \vec{s} est un vecteur du réseau réciproque.

D'après la symétrie du réseau cristallographique construit par les vecteurs $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$, les densités électroniques aux points M et M' tels que $\overrightarrow{MM'} = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c}$

sont égales. Les contributions de ces points s'ajoutent donc (en module et en phase), telles que après intégration sur la maille

$$F(hkl) = \frac{1}{V} \sum_{i=1}^n f_i e^{2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)} \quad (10.10)$$

où x_i, y_i, z_i sont les coordonnées réduites de l'atome i dans la maille et f_i le facteur de diffusion de l'atome i , qui donne une information sur le nombre d'électrons de l'atome.

Obtenue par transformée de Fourier inverse, la densité électronique s'écrit donc

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (10.11)$$

10.5 Difficultés liées à la résolution de l'équation régissant la densité électronique

Dans cette section nous exposerons les deux problèmes majeurs auxquels nous sommes confrontés lors de la résolution d'une structure de protéines par cristallographie : les erreurs de troncature et surtout le problème de la phase.

10.5.1 Erreurs de troncature

La densité électronique s'écrit sous la forme d'une série. Or, seul un nombre fini de facteurs de structure peuvent être mesurés, ce qui introduit des erreurs appelées erreurs de troncature. Elles se traduisent par une approximation de $\rho(\vec{x})$ et par un pouvoir séparateur limité. Ce dernier est lié à la résolution s d'une réflexion qui vaut

$$s = \frac{1}{d} = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \quad (10.12)$$

Le pouvoir séparateur d ne peut donc pas être supérieur à $\lambda/2$, et en pratique celui-ci est souvent limité par la résolution du cristal.

Plus les données sont collectées à haute résolution, plus le nombre $F(h,k,l)$ est grand et plus les erreurs de troncature sont réduites, ce qui donne accès à des détails plus fins dans la carte de densité électronique et qui permet donc de reconstruire un modèle plus précis de la structure de la protéine.

10.5.2 Problème de la phase

Lors de l'expérience de diffraction, c'est l'intensité qui est mesurée, qui correspond au module au carré du facteur de structure. Ainsi seules les amplitudes des facteurs de structure sont accessibles par l'expérience, les phases ne peuvent pas être mesurées. Or leur connaissance est très importante pour la résolution de la structure cristallographique, elle est d'ailleurs plus importante que la connaissance des intensités des taches de diffraction.

10.6 Méthodes de détermination de la phase des réflexions

Afin de déterminer les phases, plusieurs méthodes peuvent être mises en oeuvre [Dre2002]. En plus des méthodes directes qui s'appliquent aux petites molécules, deux méthodes permettent la détermination de phases expérimentales, il s'agit du remplacement isomorphe et de la diffusion anormale. La troisième méthode, le remplacement moléculaire, nécessite la connaissance de la structure d'une autre protéine ayant au moins 25% d'identité de séquence avec la protéine étudiée. Cette méthode permet d'utiliser les phases de la protéine connue pour résoudre la structure de la protéine étudiée. Cependant, le remplacement moléculaire introduit toujours un biais dans le calcul de la structure.

10.6.1 Remplacement isomorphe multiple (MIR)

Cette méthode nécessite la fixation d'un atome lourd (qui possède d'avantage d'électrons, et ce sont eux qui interagissent avec les rayons X) sur la protéine cristallisée. La fixation doit se faire sans modifications trop importantes de la structure de la protéine, ni de la maille cristalline afin de limiter le défaut d'isomorphisme.

Au niveau de la densité électronique, les contributions de la protéine et celle de l'atome lourd s'additionnent de sorte qu'après transformée de Fourier,

$$\overrightarrow{F_{PA}(\vec{s})} = \overrightarrow{F_P(\vec{s})} + \overrightarrow{F_A(\vec{s})} \quad (10.13)$$

où $\overrightarrow{F_{PA}}$ est le facteur de structure correspondant à la protéine avec l'atome lourd, $\overrightarrow{F_P}$ le facteur de structure correspondant à la protéine et $\overrightarrow{F_A}$ le facteur de structure

correspondant à l'atome lourd.

Les modules $|F|$ et $|F_{PA}|$ sont connus, de même que $\overrightarrow{F_A(\vec{s})}$ puisqu'après avoir déterminé la position des atomes lourds fixés il est possible de calculer $\rho(\vec{s})$ pour l'atome lourd et donc $\overrightarrow{F_A(\vec{s})}$.

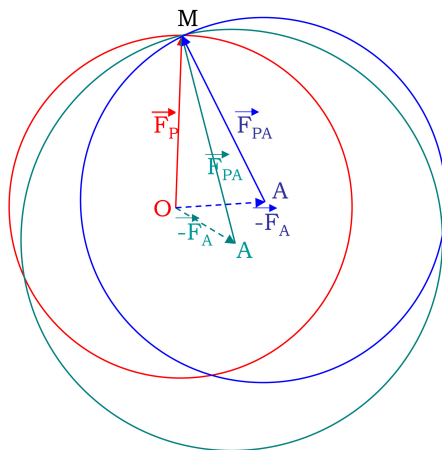


FIG. 10.3 – **Diagramme d'Argand pour la méthode MIR.** Le lieu des phases possibles de la protéine native est représenté par le cercle rouge et celui des protéines avec les métaux lourds en vert et bleu. Avec 2 complexes, la détermination de la phase est non ambiguë, c'est le point d'intersection des trois cercles.

Or, la relation 10.13 peut s'écrire vectoriellement $\overrightarrow{AM} = \overrightarrow{AO} + \overrightarrow{OM}$, et l'utilisation successive de 2 atomes lourds permet la détermination de la position du point M, c'est à dire la détermination de la phase.

Ceci se visualise sur le diagramme d'Argand (figure 10.3), où le lieu des points M pour chaque réflexion mesurée est un cercle de rayon égal au module du facteur de structure et de centre l'origine dans le cas d'un cristal natif ou le point A (extrémité du vecteur $-\overrightarrow{F_A}$ de l'atome lourd) dans le cas d'un cristal dérivé. La collecte des clichés de diffraction d'un cristal natif et d'un cristal dérivé laisse donc une ambiguïté de phase puisque 2 phases sont possibles (2 points d'intersection entre les 2 cercles) alors que la collecte des données de diffraction d'un autre cristal possédant un autre atome lourd permet de lever l'indétermination en ne gardant qu'une valeur de phase.

Cette méthode permet ainsi de déterminer les phases et de résoudre la structure cristallographique.

10.6.2 Diffusion anormale

La méthode MAD, qui utilise la diffusion anormale, permet la détermination des phases en collectant les données de diffraction à partir d'un cristal à différentes longueurs d'onde, et supprime donc le problème d'isomorphisme lié à la méthode MIR.

Dans un cristal natif les intensités des réflexion (h, k, l) et $(\bar{h}, \bar{k}, \bar{l})$ sont égales et leurs phases sont opposées ; ces réflexions forment les paires de Friedel.

Cette égalité n'est plus respectée dans le cas de la diffusion anormale (particulièrement en présence d'atomes lourds), pour des longueurs d'ondes proches du seuil d'absorption de l'atome lourd, où la diffusion des rayons X devient inélastique et une partie de l'énergie incidente absorbée est réémise sous forme de fluorescence. Dans ce cas, le facteur de diffusion atomique ne vaut plus f^0 mais

$$f = f^0 + \Delta^{\lambda} f' + i \Delta^{\lambda} f''$$

Dès lors, la loi de Friedel n'est plus respectée : $F_{hkl} \neq F_{-h-k-l}$ et c'est cette différence qui permet de calculer les phases comme on peut le visualiser sur un diagramme d'Argand anormal.

10.7 Acquisition et traitement des données

Dans cette section nous exposerons les méthodes qui ont été employées pour acquérir les clichés de diffraction avec les cristaux de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG ainsi que pour traiter ces données. Nous détaillerons les principes aussi bien que les moyens utilisés.

10.7.1 Cryo-protection et collecte des données

Afin de collecter les clichés de diffraction des cristaux soumis à un faisceau de rayons X, il a été nécessaire de les congeler dans un flux d'azote liquide pour limiter les dommages d'irradiation provoqués par les rayons X qui pourraient détruire les cristaux. Préalablement à la congélation, il est nécessaire de cryo-protéger les cristaux afin qu'il ne soient pas détruits par la glace qui se formerait. Pour cela, les cristaux sont incubés dans des solutions de cristallisation où l'eau est progressivement remplacée par du glycérol. Les incubations se font pendant 10 minutes

avec un incrément de pourcentage de glycérol de 5% entre les différents bains, ceci jusqu'à un pourcentage final de glycérol de 25%. La congélation est réalisée sur la ligne de lumière ID14-eh2 de l'ESRF (Grenoble).

Les données de diffraction ont été collectées à 100 K, à une longueur d'onde de 0,933 Å.

10.7.2 Indexation et intégration des taches de diffraction

La première étape de traitement des données de diffraction est l'indexation. L'indexation se fait image par image en affinant par exemple la distance entre le cristal et le détecteur ainsi que la position du centre du détecteur et les paramètres de maille. Chaque tache est alors indexée avec les indices h, k, l . L'intensité des taches est également mesurée par intégration sur toute la tache. Pour cela un masque est défini autour de chaque tache de diffraction, qui permet d'estimer le bruit de fond et de le retrancher de l'intensité de la tache. Cette étape est importante pour maximiser le rapport signal/bruit.

10.7.3 Mise à l'échelle et réduction des données

Il est alors possible d'associer les différentes taches de diffraction correspondant à une même réflexion par symétrie et de moyenner les intensités de ces taches, qui devraient être égales. C'est la mise à l'échelle des données. En pratique, les images diffèrent par la dose de rayons X ainsi que la baisse de pouvoir de diffraction du cristal au fur et à mesure de la collecte des données. Le facteur R_{sym} intervient ici, c'est un paramètre statistique qui renseigne sur la qualité du jeu de données collecté. Plus il est faible, plus cela signifie que des réflexions théoriquement équivalentes ont effectivement été collectées avec une même intensité.

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} I_{hkl}} \quad (10.14)$$

Au laboratoire, seules les réflexions des tranches de résolution pour lesquelles le facteur R_{sym} n'excède 35% sont prises en compte. Le rapport signal/bruit est lui aussi indicatif de la qualité des données.

L'analyse de la position des taches permet à ce stade de proposer une maille pour le réseau cristallin. Les extinctions systématiques permettent l'identification des axes du réseau cristallin.

Pour la résolution de la structure du complexe PscE-PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG, ces 2 étapes ont été réalisées par le programme Denzo [Otw1997] et Scalepack [Sch2002].

10.7.4 Recherche de la position des atomes lourds et phasage

Le phasage a été possible grâce au signal anomal de 3 ions Ni²⁺ présents dans la solution de cristallisation. Il a été fait sur les données provenant d'un cristal qui a diffracté jusqu'à 2.2 Å.

La recherche des atomes lourds peut se faire grâce aux sections de Harker des cartes de Patterson, qui présentent des pics correspondants aux vecteurs inter-atomiques inter et intramoléculaires. Les pics correspondant aux vecteurs entre atomes lourds y sont beaucoup plus intenses. Leur positions peuvent alors être déterminées, puis il est nécessaire de les affiner.

Dans le cadre de la résolution de la structure de PscE-PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG, les sites de fixation des ions Ni²⁺ ont été déterminés par SHELXD [Sch2002] grâce au programme AutoSHARP [dlF1997]. Avec AutoSHARP, particulièrement efficace pour traiter des données anormales faibles, la position des atomes lourds est affinée par maximisation de la vraisemblance.

Les phases sont alors calculées et elles aussi affinées par des méthodes statistiques. Elles se répartissent selon une distribution de probabilité $P(\alpha)$ autour de la meilleure phase (best) qui est la moyenne pondérée des phases calculées :

$$F_{best} = \frac{\sum_{\alpha} P(\alpha) F(\alpha)}{\sum_{\alpha} P(\alpha)} \quad (10.15)$$

et alors $F_{hkl}(\text{best})$ s'écrit

$$F_{hkl}(\text{best}) = |F_{hkl}| \times m \times e^{i\alpha_{best}}; m = \frac{|F_{hkl}(\text{best})|}{|F_{hkl}|} \quad (10.16)$$

m est le facteur-de-mérite (FOM), un indicateur de la qualité des phases. Il doit être proche de 1.

Une carte de densité électronique interprétable a été calculée grâce aux phases expérimentales α_{best} et aux amplitudes $|F_{hkl}|$ après modification de solvant afin de réduire le bruit dû au solvant dans la carte de densité électronique. Cette étape a été réalisée par autoSHARP grâce aux programmes SOLOMON [Abr1996] et DM

[Cow1994]. 200 résidus du modèle de PscE:PscF^{55–85}:PscG ont ensuite été placés automatiquement dans la carte de densité expérimentale par ARP/wARP.

10.7.5 Remplacement moléculaire

La carte de Patterson représente les vecteurs entre les atomes appartenant à la même unité asymétrique. C'est une signature de la structure de la protéine.

La technique du remplacement moléculaire utilise les fonctions de Patterson d'un modèle de la protéine d'intérêt et consiste à placer le modèle dans la maille du cristal étudié.

Pour cela, le modèle est tout d'abord orienté par rapport à la protéine étudiée selon les trois angles d'Euler afin de maximiser la fonction de corrélation entre la fonction de Patterson du modèle auquel ces rotations sont appliquées et celle de la protéine étudiée.

Des translations dans les trois directions sont alors appliquées au modèle afin de maximiser la fonction de corrélation entre les modules des facteurs de structure du modèle, après application des rotations et des translations, et ceux de la protéine étudiée [Lat1985].

Pour la résolution de la structure de PscE:PscF^{55–85}:PscG, le remplacement moléculaire réalisé avec AmoRe [Nav2001] a permis d'injecter les phases calculées précédemment à partir du jeu de données à 2.2 Å traité de façon anormale dans un jeu de données issu d'un cristal ayant diffracté jusqu'à 2.0 Å de résolution, et ainsi d'améliorer le modèle de la structure du complexe ternaire.

10.7.6 Affinement

Après l'obtention d'un premier modèle, l'affinement de celui-ci permet d'améliorer le modèle afin qu'il corresponde mieux aux données expérimentales. En utilisant la suite CNS, les 4 paramètres de chaque atome (3 coordonnées et le facteur d'agitation thermique B) sont affinés. Cependant le nombre d'observations est alors inférieur au nombre de paramètres à affiner, ce qui ne permet pas la convergence du modèle. Des paramètres sont alors imposés, ce sont des longueurs de liaisons et angles qui ont été calculés dans le cas de petites molécules.

Plusieurs méthodes numériques sont envisageables, les plus couramment utilisées sont des méthodes de gradient conjugué (qui ne permettent d'atteindre que

les minima locaux) ou des méthodes de recuit simulé, qui ont un rayon de convergence plus élevé et permettent donc d'atteindre des minima plus lointains.

CNS [Bru1998], utilisé pour l'affinement de la structure de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG, permet de franchir des barrières énergétiques entre différents états conformationnels du système en le chauffant, ce qui confère une énergie cinétique à chaque atome. Le refroidissement se fait ensuite progressivement, ce qui favorise les états énergétiques de plus basse énergie. Lors de l'étape de recuit simulé, les autres contraintes peuvent être légèrement relâchées afin de permettre davantage de flexibilité au système.

Le facteur R permet de suivre et valider l'affinement :

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs} - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (10.17)$$

où k est le facteur d'échelle entre F_{obs} et F_{calc} , paramètre qui est lui aussi affiné.

Cependant la modification des paramètres durant l'affinement influe sur les $|F_{obs}|$ et ce facteur est donc biaisé. Afin d'y remédier, 5% des réflexions sont exclues de l'affinement (F_{obs_free}) et servent à calculer le facteur R_{free} , qui est lui une valeur non biaisée. Si l'affinement est correct, les facteurs R et R_{free} diminuent conjointement. Une diminution du R_{free} sans diminution de R est un signe de sur-affinement ; modélisation du bruit et non affinement du modèle.

Une deuxième partie de l'affinement se fait "à la main" en déplaçant les résidus dans la carte de densité. Pour cela on dispose de 2 cartes, la carte de densité électronique $\{2f_{obs} - f_{calc}, \Phi_{calc}\}$ et la carte de densité électronique résiduelle $\{f_{obs} - f_{calc}\}$.

L'affinement est fait manuellement en déplaçant légèrement les chaînes principales et latérales (changement de conformères) de façon à ce que le modèle corresponde bien à la carte $\{2f_{obs} - f_{calc}, \Phi_{calc}\}$ et que la carte résiduelle $\{f_{obs} - f_{calc}\}$ soit "plate", c'est à dire qu'elle ne contienne plus de pics positifs, interprétables comme un atome manquant dans le domaine, ou négatif, interprétable comme un atome en trop, mal placé. A la fin de l'affinement de la structure de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG, la carte résiduelle observée à $\sigma=2.5$ ne contient pas de pics résiduels non interprétables. Elle reste cependant légèrement bruitée.

La stéréochimie de la protéine (longueur des liaisons et angles) confirme également la qualité de l'affinement.

Ici, l'affinement de la structure a été conduit itérativement à l'aide du logiciel COOT (<http://www.ytbl.york.ac.uk/~emsley/coot>) afin que le modèle se positionne mieux dans la carte de densité $2f_o-f_c$ et en utilisant la suite CNS [Bru1998].

Quatrième partie

Résultats et discussion

Chapitre 11

Comportement de PscF sauvage

PscF est une protéine de 85 résidus (9.2 kDa) qui, chez *P. aeruginosa*, polymérise après avoir été sécrétée pour former l'aiguille de sécrétion de type III [Pas2005]. Afin de vérifier sa fonctionnalité *in vitro* nous avons surexprimé et purifié PscF dans *E. coli*.

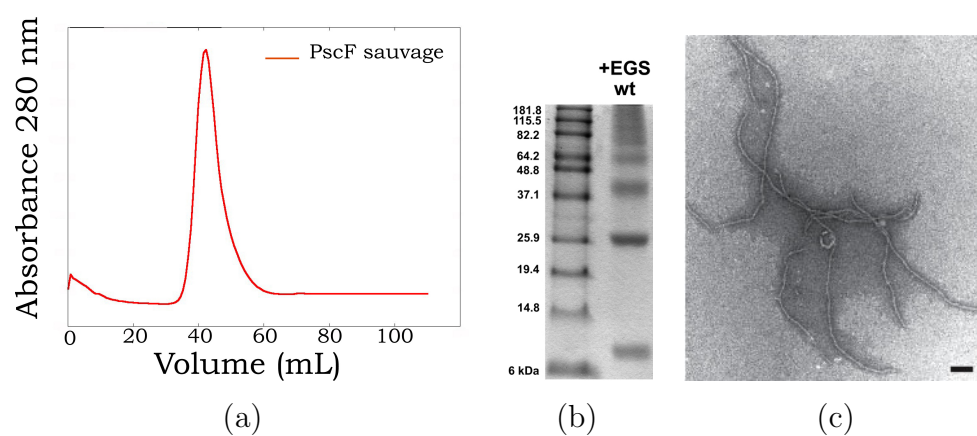


FIG. 11.1 – **Polymérisation spontanée de PscF surexprimée chez *E. coli*.** (a) PscF est éluée dans le volume mort d'une colonne d'exclusion de taille Hiload Superdex 200 (Amersham Biotech). (b) Pontage chimique de PscF montrant une échelle caractéristique d'une fibre. (c) Cliché de microscopie électronique par coloration négative montrant des fibres de PscF polymérisées (barre d'échelle : 800 Å) (D'après QUINAUD et al., 2005 [Qui2005]).

Lors du passage sur la colonne d'exclusion de taille¹, PscF est éluée très tôt, au niveau du volume vide de la colonne (figure 11.1-a). A ce volume, des particules de haut poids moléculaire sont éluées (plus de 300 kDa), ce qui correspond à des protéines agrégées ou, dans notre cas, polymérisées. De plus, la faible solubilité de PscF observée durant les étapes de purification (concentration difficile) est cohérente avec cet état de polymère. Enfin, le pontage chimique de PscF avec l'agent de pontage EGS piège différents états d'oligomérisation de la molécule qui sont ensuite observés sur gel d'acrylamide dénaturant (figure 11.1-b). Ce résultat est typique de ce qui est observé pour une fibre, et a également été décrit pour YscF [Tor2005].

Afin de déterminer la nature polymérisée de PscF ainsi purifiée nous avons étudié l'échantillon de PscF par microscopie électronique par coloration négative (figure 11.1-c) au Laboratoire de Microscopie Électronique Structurale (LMES, IBS), en collaboration avec Emmanuelle NEUMANN. De longues fibres de taille hétérogène et supérieure à 1 μm ont été observées, bien plus longues que les aiguilles qui sont formées *in vivo*. (QUINAUD *et al.*, 2005 [Qui2005]).

Si une telle polymérisation prématurée avait lieu dans le cytoplasme avant la sécrétion de PscF, cette dernière ne pourrait plus être sécrétée à travers le pore de sécrétion. De plus il est probable que la présence de telles fibres désordonnées dans le cytoplasme bactérien perturberait lourdement l'ensemble du métabolisme de la bactérie. Il faut donc que cette polymérisation soit bloquée dans le cytoplasme par des protéines partenaires qui jouent le rôle de chaperonnes.

Enfin, la propension de PscF à former des fibres de différentes longueurs *in vitro* (figure 11.1-c) compromet l'étude structurale à haute résolution de la protéine entière, l'hétérogénéité de structure de la préparation ne permettant pas l'obtention des cristaux nécessaires à l'étude structurale par cristallographie, ni l'acquisition de spectres de RMN interprétables. Afin d'obtenir une information structurale sur cette protéine, 2 approches sont alors envisageables :

- obtenir un fragment soluble de PscF (forme tronquée) et étudier sa structure
- ou trouver, dans le cytoplasme bactérien, une (des) protéine(s) partenaire(s) qui stabiliseraient PscF et étudier structuralement le complexe ainsi formé.

¹Chromatographie par exclusion de taille : Méthode de séparation des protéines selon leur taille. Par gravité, les protéines sont éluées selon leur rayon hydrodynamique.

Chapitre 12

Forme monomérique de PscF

Nous avons dans un premier temps construit un mutant de PscF incapable de polymériser, et après l'avoir caractérisé biophysiquement et fonctionnellement nous avons initié des essais de cristallogénèse.

12.1 Construction et caractérisation d'un mutant monomérique de PscF

Les programmes de prédiction de structure secondaire proposent un repliement en hélice α amphiphile¹ pour les résidus 68 à 85 à l'extrémité C-terminale de PscF. Or de telles hélices sont propices à des interactions protéine-protéine de type *coiled coil* et pourraient donc participer aux contacts entre monomères au sein de l'aiguille assemblée. De plus dans le cas du flagelle, l'assemblage se fait par le biais des extrémités des molécules de flagelline [Sam2001]. Nous avons ainsi fait l'hypothèse que l'extrémité C-terminale de PscF pourrait être impliquée dans la polymérisation de la fibre. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé par mutagenèse dirigée un mutant de PscF délété de ses 18 derniers résidus C-terminaux que nous noterons PscF¹⁻⁶⁷ (la protéine sauvage possède 85 acides aminés) (figure 12.1-b).

Nous avons montré précédemment que PscF est éluée dans le volume mort d'une colonne d'exclusion de taille, ce qui est en accord avec la formation de

¹hélice amphiphile : hélice qui possède une face hydrophile (exposée au solvant) et une face hydrophobe.

fibres de PscF. En revanche, après avoir été purifiée, PscF¹⁻⁶⁷ est éluée dans cette même colonne à un volume correspondant à un état monomérique (figure 12.1-a), confirmant l'hypothèse selon laquelle l'hélice α C-terminale de PscF est nécessaire à la polymérisation.

De plus, nous avons effectué des essais de pontage chimique avec l'agent pontant EGS, qui lie covalamment les lysines libres proches (figure 12.1-b). Suite à l'incubation de PscF avec l'EGS, des bandes de plus haut poids moléculaire, correspondant à différents états oligomériques, sont observées sur gel SDS-PAGE. Cependant, aucune bande de poids moléculaire supérieur à celui du monomère n'est observée suite à l'incubation de PscF¹⁻⁶⁷ avec l'EGS. Ceci confirme la nature monomérique de PscF¹⁻⁶⁷.

Des études de cytotoxicité ont été réalisées sur des macrophages de souris de la lignée cellulaire J774 par l'équipe d'Ina ATTRÉE (iRTSV) en complétant la souche clinique CHA de *P. aeruginosa* délétée en *pscF* par un plasmide portant le gène *pscF*¹⁻⁶⁷. Elles ont montré que ce mutant est peu cytotoxique, bien que PscF¹⁻⁶⁷ soit exprimée et stable dans le cytoplasme (figure 12.1-d). Ainsi l'hélice α C-terminale de PscF est nécessaire à la cytotoxicité de la bactérie.

Après migration sur gel natif, PscF¹⁻⁶⁷ apparaît sous forme d'une bande unique fine (non montré), ce qui est de bon augure pour le bon repliement de cette protéine. De plus son spectre de dichroïsme circulaire correspond à un repliement en hélices α (non montré), ce qui confirme que PscF¹⁻⁶⁷ est, au moins partiellement, correctement repliée.

Des études d'interaction en gel natif n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre PscF¹⁻⁶⁷ et PscE et/ou PscG. La forme entière de PscF serait donc requise pour l'interaction avec ses deux partenaires (identifiés au chapitre 13 p.151). De plus, toujours en gel natif, ce mutant n'est pas capable d'interagir avec PcrV (non montré).

L'étude de stabilité par dénaturation thermique suivie par dichroïsme circulaire a montré que PscF¹⁻⁶⁷ est peu stable et commence à se dénaturer dès 4 °C (figure 12.1-c), ce qui est en accord avec la faible solubilité de PscF¹⁻⁶⁷ (8 mg/mL) et n'est pas bon signe pour les études structurales à venir. La polymérisation en fibre de PscF stabiliserait donc le monomère, qui, sinon, se dégraderait rapidement. Un tel phénomène a également été observé chez *S. flexneri* et *S. typhimurium* où les formes monomériques de MxiH et PrgI sont peu stables, et la polymérisation

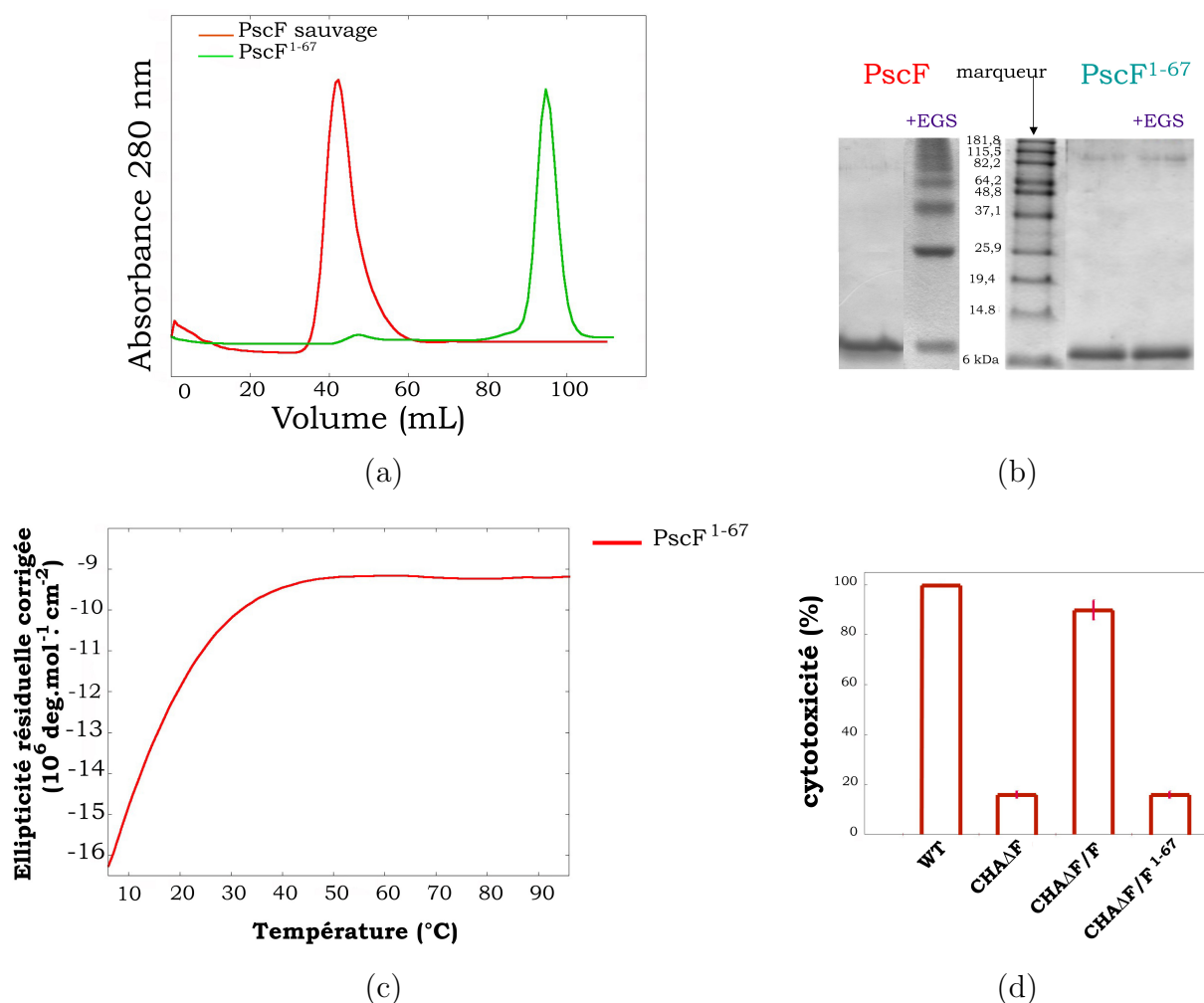


FIG. 12.1 – *Etudes biophysiques et fonctionnelles de la forme monomérique de PscF; PscF¹⁻⁶⁷*. (a) PscF¹⁻⁶⁷ est éluée comme une protéine monomérique de 8kDa sur une colonne d'exclusion de taille Hiloal Superdex 200 (Amersham Biotech) (vert), alors que la forme sauvage de PscF est éluée dans le volume mort (rouge). (b) Pontage chimique avec l'agent EGS de l'échantillon de PscF¹⁻⁶⁷. Aucune bande protéique correspondant à des oligomères n'est visible. (c) Dénaturation thermique de PscF¹⁻⁶⁷ suivie par spectroscopie de dichroïsme circulaire. PscF¹⁻⁶⁷ est très peu stable et commence à se dénaturer dès 4°C. (d) La souche CHA délétée en pscF complémentée par pscF¹⁻⁶⁷ (CHAΔF/F¹⁻⁶⁷) est peu cytotoxique.

en fibres s'accompagnerait d'une stabilisation de l'assemblage [Dar2006].

12.2 Essais de cristallogenèse

Des essais de cristallogenèse ont cependant été initiés avec le robot Cartésien de l'EMBL à Grenoble (European Molecular Biology Laboratory) (<http://www.embl-grenoble.fr/groups/htt/crystallisation.html>) après clivage de l'étiquette histidine par la thrombine, et poursuivis manuellement. Des cristaux poussent par diffusion de vapeur en goutte suspendue après 5 jours à 20 ° C (figure 12.2) en mélangeant 1 μ L de solution protéique à 4 mg/mL environ et 1 μ L de solution mère contenant :

- 0,7 M sulfate d'ammonium et 0,1 M MES pH 6,6,
- ou 0,8 M phosphate de sodium di-hydrogéné et 0,1 M MES pH 6,6.



FIG. 12.2 – *Cristaux de PscF¹⁻⁶⁷ dans 0.8M Phosphate de sodium di-hydrogéné et 0.1M MES pH 6.6.*

Cependant ils n'ont pu diffracter des rayons X qu'à basse résolution (10 Å).

De plus, le spectre RMN 1D de ce fragment monomérique de PscF obtenu en collaboration avec Jean-Pierre SIMORRE au laboratoire de résonance magnétique nucléaire (LRMN) a mis en évidence un rassemblement de pics pour des déplacements chimiques compris entre 7 et 8 ppm, ce qui correspond à une protéine mal structurée.

Etant donné la mauvaise qualité de ces cristaux en terme de diffraction et l'impossibilité de résoudre la structure de PscF¹⁻⁶⁷ par RMN (les pics du spectre RMN 1D sont mal résolus, non montré), nous avons choisi la seconde méthode consistant à trouver des partenaires cytoplasmiques de PscF chez *P. aeruginosa*.

Chapitre 13

Complexe ternaire PscE:PscF:PscG

Dans cette section, nous identifierons et caractériserons d'un point de vue biophysique et fonctionnel le complexe hétérotrimérique PscE:PscF:PscG. La formation de ce complexe est requise pour la cytotoxicité de *P. aeruginosa* puisqu'il bloque la polymérisation prématurée de PscF dans le cytoplasme bactérien et maintient PscF dans une conformation compatible avec sa sécrétion future [Qui2005].

Ce travail a été accompli en étroite collaboration entre les laboratoires d'Ina ATTRÉE (iRTSV) et d'Andréa DESSEN (IBS) (Grenoble). Conformément aux dominantes de chacune des équipes ainsi qu'au matériel de laboratoire disponible, les expériences de microbiologie (manipulations *in vivo* chez *P. aeruginosa* et notamment les mesures de cytotoxicité) ont été réalisées à l'iRTSV alors que les études biophysiques et structurales ont été menées à l'IBS qui fait partie du PSB¹. La biologie moléculaire a été conduite dans les 2 laboratoires.

¹PSB : Partenariat pour la Biologie Structurale. Il regroupe notamment l'EMBL, l'ESRF, l'ILL et l'IBS

13.1 Identification du complexe PscE:PscF:PscG, cytoplasmique et soluble

13.1.1 Identification de PscE:PscF:PscG

Afin de mettre en évidence et d'identifier des partenaires de PscF dans le cytoplasme de *P. aeruginosa*, nous avons purifié les produits de la surexpression dans *E. coli* d'un vecteur polycistronique codant pour la section *pscEFGHI* de l'opéron *exsD-pscEFGHIJKL* dans laquelle une étiquette hexahistidine a été introduite à l'extrémité N-terminale de PscE.

Après purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni- Sépharose chargée en ions Ni^{2+} suivie d'une chromatographie par exclusion de taille, trois protéines ont été co-purifiées, identifiées comme His₆-PscE (9326 Da), PscF (9153 Da) et PscG (12451 Da) par spectrométrie de masse dénaturante et séquençage N-terminal. Une analyse par spectrométrie de masse native a par ailleurs conclu à la stœchiométrie 1:1:1 du complexe ternaire en révélant une masse de 30933 Da (alors que la masse attendue pour un complexe 1:1:1 est de 30930Da).

En outre, un complexe 1:1 entre PscE et PscG a également été mis en évidence par gel natif et chromatographie d'exclusion de taille après mélange équimolaire des deux protéines purifiées séparément. Chez *Y. pestis*, une interaction entre YscE et YscG avait en outre déjà été mise en évidence [Day2000].

C'est la première fois qu'une protéine du T3SS qui polymérise a été montrée complexée avec 2 protéines partenaires avant sa polymérisation. En ce sens, l'identification des partenaires de PscF est novatrice.

Il est à noter que des essais de coexpression et copurification des hypothétiques complexes binaires His₆-PscE:PscF et His₆-PscF:PscG ont également été menés après construction des vecteurs bicistroniques portant les gènes *pscE-pscF* ou *pscF-pscG*. Cependant, dans les deux cas, bien que les 2 protéines aient été surexprimées correctement, seule la protéine marquée d'une étiquette histidine a été purifiée après chromatographie par affinité au nickel. Ainsi dans les 2 cas, une protéine partenaire seule (PscE ou PscG) n'a pas été capable de complexer de façon stable PscF afin de maintenir cette dernière sous une forme monomérique. Les 2 protéines PscE et PscG sont donc nécessaires, conjointement, pour prendre en charge le monomère de PscF [Qui2005].

La recherche d'orthologues de PscE et PscG chez les autres organismes pathogènes dotés d'un T3SS a abouti chez *Y. pestis* à YscE et YscG, avec 25% et 47% d'identité de séquence avec PscE et PscG respectivement, YscE et YscG chez *Vibrio parahaemolyticus*, YscE et LscG chez *P. luminescens* et AscE et YscG chez *Aeromonas hydrophilia* (fig 13.1). Ces bactéries possèdent toutes un injectisome de sécrétion de type III de la famille des Ysc [Cor2006] ; le complexe ternaire similaire à PscE:PscF:PscG semble être une caractéristique de cette famille. Ainsi le complexe ternaire ne serait pas particulier à *P. aeruginosa*, et les connaissances qui seront acquises sur ce complexe pourraient être appliquées au système de sécrétion de type III de cette famille. En dehors, seule SsaE chez *S. typhimurium* est un homologue possible de PscE avec 22% d'identité de séquence, aucun homologue possible de PscG n'a été trouvé chez cette bactérie.

De plus, des recherches par PSI-BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast/>) dans les banques de données Swiss-Prot/trEMBL n'ont pas permis de trouver de protéines à 2 domaines dont l'un correspondrait à PscE et l'autre à PscG, ce qui montre que ces deux protéines partenaires ne dérivent pas d'un ancêtre unique et que la présence de deux protéines séparées est nécessaire pour qu'elles remplissent leur fonction.

13.1.2 Etude de PscE:PscF:PscG chez *P. aeruginosa*

Afin d'approfondir l'étude du complexe ternaire PscE:PscF:PscG, des études *in vivo* ont été menées par l'équipe d'Ina ATTRÉE (iRTSV). Les résultats sont présentés dans ce paragraphe et le suivant.

Dans la souche sauvage CHA, le gène chromosomique *pscE* a été délété par technique de double recombinaison. La souche résultante est nommée CHA Δ E. De la même façon une souche CHA Δ G a également été construite. La souche CHA Δ E a ensuite été complémentée par un plasmide codant pour His₆-PscE et de même CHA Δ G a été complémentée par un plasmide codant pour His₆-PscG.

Après croissance dans des conditions inductrices pour le T3SS (déplétion en calcium), les extraits cytoplasmiques solubles ont été incubés avec des billes de résine Sépharose chargés en nickel. Après lavage et élution grâce à un palier à 300mM d'Imidazole, les trois protéines PscE, PscF et PscG ont été éluées dans les 2 cas, identifiées par une analyse par Western blot (fig. 13.2-a). Afin de pouvoir

exclure une liaison non spécifique de protéines de *P. aeruginosa* sur ces billes, l'extrait soluble de la souche CHA a également été incubé avec ces mêmes billes et effectivement, dans ce cas, aucune protéine ne reste accrochée après les étapes de lavage. Les 2 autres protéines partenaires non marquées ont donc été co-élues avec la protéine fusion parce qu'elles forment un complexe avec elle. Le complexe ternaire PscE:PscF:PscG est donc présent chez *P. aeruginosa*.

Afin de déterminer la localisation des partenaires PscE et PscG, ces derniers ont été recherchés dans le surnageant et dans l'extrait cytoplasmique de cultures de *P. aeruginosa* en conditions inductrices pour le T3SS. Ces protéines n'y ont pas été détectées alors qu'elles sont exprimées et stables dans le cytoplasme, ce qui suggère que PscE et PscG ne sont pas exportées et restent dans le cytoplasme bactérien (figure 13.2-b).

13.2 Caractérisation fonctionnelle de PscE:PscF:PscG

Afin de mettre en évidence la nécessité de la présence conjointe des deux partenaires PscE et PscG pour prendre en charge PscF et garantir la cytotoxicité de la bactérie, nous avons utilisé les souches CHAΔE et CHAΔG.

Dans les deux cas, ces souches ne sont pas cytotoxiques envers la lignée cellulaire de macrophages J774 (figure 13.3-c, colonnes 2-3). On remarque de plus que lorsque le gène codant pour l'une des deux protéines partenaires PscE ou PscG est délété, l'autre protéine n'est pas stable dans le cytoplasme ; elle est rapidement dégradée (figure 13.3-a). PscE et PscG se co-stabilisent ainsi mutuellement.

En outre, dans le cas où la souche délétée de *pscE* ou *pscG* est complémentée par un plasmide portant les gènes *pscE* ou *pscG* respectivement, la cytotoxicité de la bactérie est rétablie. Cela montre que la mutation ne modifie pas l'expression des gènes situés en aval du gène délété dans l'opéron.

Enfin, pour chacune des souches CHAΔE et CHAΔG, PscF n'est pas présent dans le cytoplasme bactérien, ce qui suggère qu'en l'absence d'au moins PscE ou PscG, PscF n'est pas stable et est rapidement dégradée.

Néanmoins, la surexpression de PscF dans les souches CHAΔE et CHAΔG rétablit le niveau d'expression de PscF dans le cytoplasme bactérien. Cependant, PscF n'est dans ce cas pas exportée et la bactérie n'est pas cytotoxique (figure 13.3-b-c, colonnes 4-5), ce qui suggère qu'en l'absence de l'une de ses protéines parte-

naires, PscF agrège ou polymérise dans le cytoplasme bactérien, de façon similaire à ce qui a été observé chez *E. coli*.

Ainsi nous avons montré que la présence simultanée des deux protéines cytoplasmiques PscE et PscG est nécessaire au maintien de l'effecteur PscF sous forme monomérique et soluble, compatible avec son exportation à travers la membrane cytoplasmique. Ces deux protéines sont donc requises pour la cytotoxicité de *P. aeruginosa*.

Les homologies entre PscE et YscE ainsi qu'entre PscG et YscG suggèrent que chez *Y. pestis* également, deux partenaires stabilisent YscF dans le cytoplasme bactérien, bloquant ainsi sa polymérisation prématurée. Le complexe ternaire a en outre été mis en évidence ultérieurement chez cette bactérie (I. SORG et G. R. CORNELIS, non publié).

Afin de mieux comprendre les rôles respectifs de PscE et PscG nous avons effectué une étude de stabilité des différents partenaires du complexe ternaire par dénaturation thermique suivie par spectroscopie de dichroïsme circulaire.

13.3 Co-stabilisation de PscE, PscF et PscG

La spectroscopie de dichroïsme circulaire en UV lointain (spectre de 180 nm à 250 nm) renseigne sur la structure secondaire de la protéine étudiée (partie Matériel et Méthodes, chapitre 8). En particulier, le signal d'une protéine repliée majoritairement en hélices α présente deux minima bien marqués à 208 nm et 222 nm.

Les spectres observés pour PscE, PscG, PscF (les 3 protéines ayant été exprimées et purifiées séparément) ainsi que pour les complexes PscE:PscG (suite au mélange des 2 protéines dans un rapport 1:1) et PscE:PscF:PscG (les 3 protéines ayant été co-exprimées et co-purifiées) présentent tous ces deux minima, ce qui confirme la présence d'hélices α dans leur structure secondaire, conformément aux prédictions du programme PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

La dénaturation thermique est suivie à 222 nm afin d'avoir un maximum de signal, entre 4°C et 96°C.

Les spectres ainsi obtenus pour PscE, PscG, PscE:PscG et PscE:PscF:PscG présentent tous une transition thermique coopérative et sigmoïdale, ce qui rend cette transition compatible avec un modèle de repliement à 2 états. Dans un

tel modèle, le repliement est considéré comme une réaction chimique entre un état complètement déplié et état complètement replié, sans passage par un intermédiaire réactionnel. De plus, un tel repliement se fait de manière autonome, sans l'intervention de protéines extérieures.

Les complexes binaires et ternaires ont des températures de fusion élevées, de 62°C et 64°C respectivement.

Les partenaires PscE et PscG séparés ont eux des températures de fusion plus basses, de 53°C et 52°C respectivement. De plus, la transition thermique est dans ce cas plus lente puisqu'elle se fait sur plus de 50°C.

Cela montre que les partenaires PscE et PscG seuls sont moins stables que le complexe PscE:PscG, ce dernier étant un peu moins stable que le complexe ternaire PscE:PscF:PscG. Les trois protéines se co-stabilisent donc à l'intérieur du complexe.

PscF quand à lui, surexprimé seul et donc polymérisé en de longues fibres, est très stable puisqu'il ne subit pas de transition thermique. La forme polymérisée est ainsi la forme la plus stable pour PscF, ce qui explique qu'elle polymérise spontanément et que ses partenaires PscE et PscG soient nécessaires pour bloquer la polymérisation prématurée de PscF, énergétiquement favorable mais fonctionnellement défavorable.

De plus, les courbes de transition thermique sont toutes réversibles et les spectres de dichroïsme circulaire avant et après dénaturation/renaturation sont superposables. Cela montre que non seulement les protéines sont capables de se replier de façon autonome après avoir été dépliées, mais également que sans agent extérieur, les complexes binaires et ternaires se reforment.

Cette augmentation de stabilité, suite à la formation des complexes binaires et ternaires est à mettre en relation avec les différences de solubilité observées lors des purifications de ces protéines. En effet PscE et PscG purifiées seules sont peu solubles (≤ 5 mg/mL), le complexe binaire PscE:PscG est moyennement soluble (~ 20 mg/mL), alors que le complexe ternaire PscE:PscF:PscG est très soluble (≥ 100 mg/mL). Les trois protéines du complexe participent donc à la solubilité et à la stabilité du complexe, par exemple en protégeant des parties hydrophobes qui pourraient être exposées dans le cadre des protéines isolées et seraient enfouies dans le cadre des complexes binaires et ternaires assemblés.

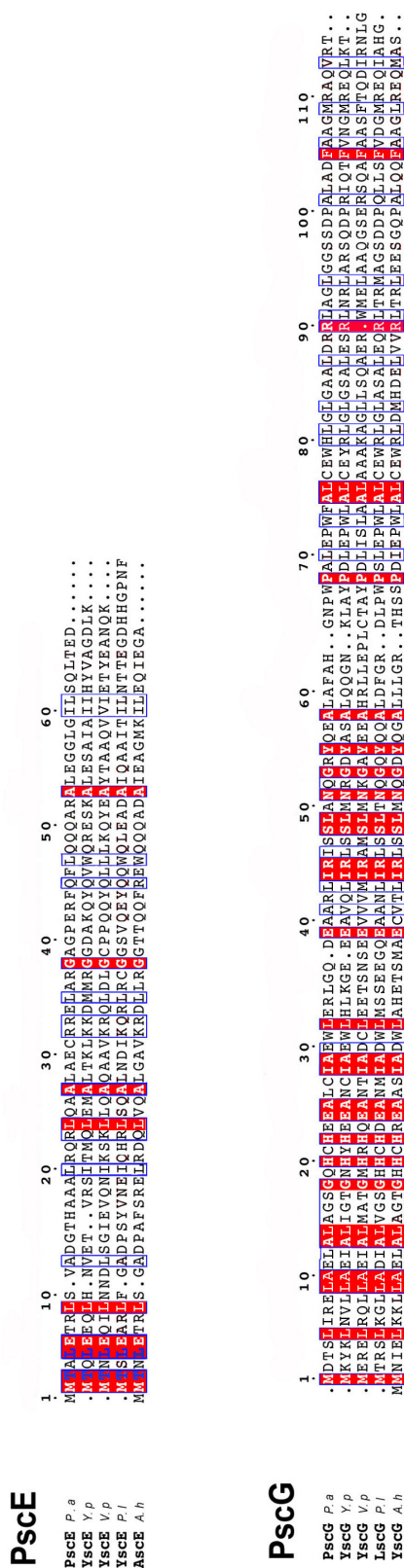


FIG. 13.1 – Alignement de séquences de PscE et PscG chez d'autres bactéries : *Y. pestis*, *V. parahaemolyticus*, *P. luminescens* et *A. hydrophilia*. Les résidus conservés sont sur fond rouge, les résidus homologues encadrés en bleu.

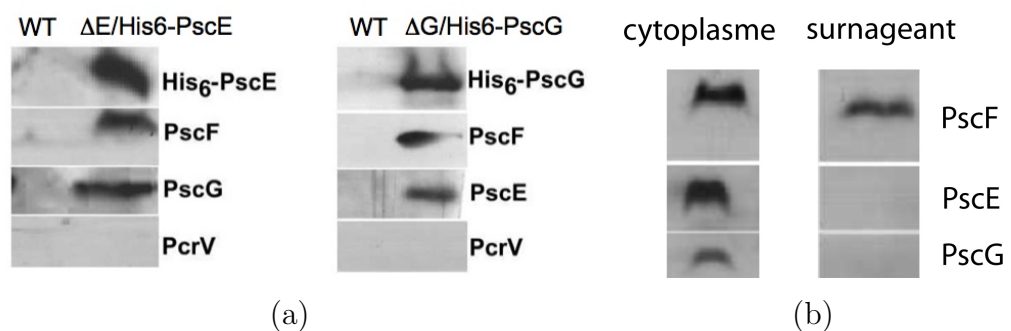


FIG. 13.2 – *Mise en évidence de PscE:PscF:PscG et localisation des 3 protéines chez P. aeruginosa*. (a) Mise en évidence de PscE:PscF:PscG par pull-down dans l'extrait cytoplasmique de *P. aeruginosa*. La souche CHA délétée de *pscE* ou *pscG* et complémentée par un plasmide portant le gène codant pour His₆-PscE ou His₆-PscG respectivement permet la co-élution par affinité pour le nickel des 3 protéines. En contrôle, pour la souche sauvage, aucune protéine n'est retenue par affinité. (b) Recherche des 3 protéines dans le cytoplasme et dans le surnageant de cultures de *P. aeruginosa* (souche CHA) dans des conditions inductrices pour le T3SS (déplétion en calcium). PscE et PscG restent cytoplasmiques alors que PscF est sécrétée. En effet, alors que les 3 protéines sont exprimées et stables dans le cytoplasme, seule PscF est détectée dans le surnageant bactérien (QUINAUD et al., 2005 [Qui2005]).

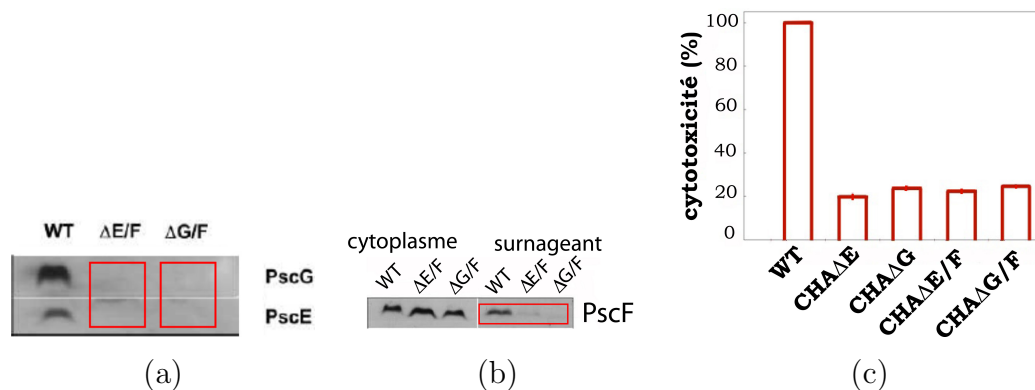


FIG. 13.3 – **Nécessité de la présence conjointe de PscE, PscF et PscG pour la cytotoxicité de *P. aeruginosa*.** (a) Recherche par Western Blot de PscE et PscG dans le lysat soluble de la souche sauvage, de la souche délétée en *pscE* et complétée par un plasmide portant *pscF* ainsi que de la souche délétée en *pscG* et complétée par un plasmide portant *pscF*. Dans le cas où *pscE* est délétée on n'observe pas PscG, et réciproquement. PscE et PscG se co-stabilisent donc dans le cytoplasme bactérien. (b) Détection de PscF dans le lysat soluble et dans le surnageant pour les 3 souches utilisées précédemment. Alors que PscF est exprimée et stable dans les 3 cas, sa sécrétion n'est possible qu'en présence de ses 2 partenaires PscE et PscG. (c) Cytotoxicité de ces 3 souches envers la lignée cellulaire J774 de macrophages. La présence conjointe de PscF et ses 2 partenaires est nécessaire pour la cytotoxicité de *P. aeruginosa*. (QUINAUD et al., 2005 [Qui2005]).

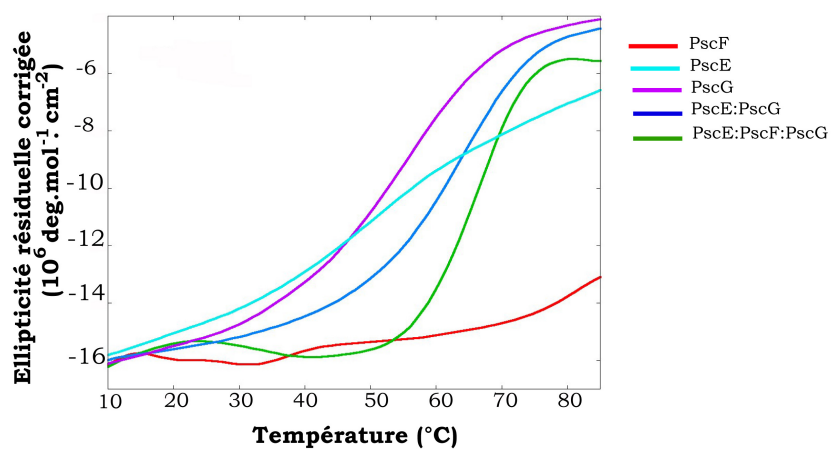


FIG. 13.4 – *Dénaturation thermique de PscE, PscF, PscG, PscE:PscG et PscE:PscF:PscG suivie par spectrométrie de dichroïsme circulaire. PscE:PscF:PscG (vert) est plus stable que PscE:PscG (bleu), lui-même plus stable que PscE ou PscG seules (violet et cyan respectivement). La forme polymérisée de PscF (rouge) est la plus stable puisqu'elle ne subit pas de transition thermique.*

Chapitre 14

Détermination de la structure tridimensionnelle de PscE:PscF:PscG

Afin de mieux comprendre les rôles respectifs des 3 protéines du complexe PscE:PscE:PscG, nous avons mené des études cristallographiques sur celui-ci. Le complexe entier n'ayant pas permis l'obtention de cristaux diffractant plus finement que 10 Å, nous avons déterminé une partie plus stable du complexe, dont nous avons pu résoudre la structure par cristallographie. Dans cette section nous décrirons ce cheminement de la forme entière vers la forme tronquée de l'hétérotrimère et la résolution de sa structure tridimensionnelle.

14.1 Essais de cristallogenèse sur le complexe ternaire entier

Le complexe entier PscE:PscF:PscG a permis l'obtention de cristaux qui poussent par diffusion de vapeur en goutte suspendue après 2 semaines à 20°C et pour une concentration protéique de 50 mg/mL (figure 14.1). La solution de puits comporte 30% PEG 400, 0.2 M citrate de sodium, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 4% heptanetriol et les cristaux ne poussent que si le mélange est réalisé manuellement dans des boîtes de cristallisation Hampton. L'addition de l'heptanetriol a permis d'augmenter le volume des cristaux jusqu'à $4.10^3 \mu m^3$ environ. Cependant, ces cristaux

particulièrement fragiles (ils sont composés d'un empilement de feuillets) se sont révélés être de mauvaise qualité ; ils présentent une faible diffraction (environ 9 Å) et n'ont pu être améliorés par aucune des techniques essayées (recuit, pontage chimique dans les cristaux ou assèchement avec le PEG [Her2005]).

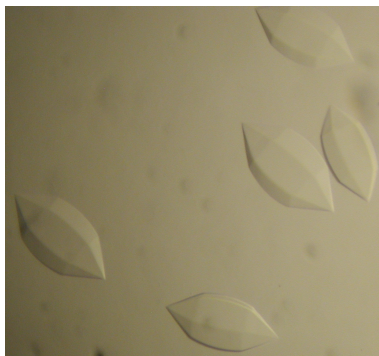


FIG. 14.1 – *Cristaux de PscE:PscF:PscG dans 30% PEG 400, 0.2M citrate de sodium, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 4% heptanetriol.*

Nous avons alors supposé qu'une partie du complexe ternaire était flexible, et que cette flexibilité gênait l'empilement cristallin. Ceci nous a conduit à déterminer une partie plus stable du complexe ternaire en effectuant des tests de protéolyse ménagée avec plusieurs protéases dans le but de couper les zones flexibles, ceci afin d'obtenir la structure cristallographique d'une partie du complexe ternaire.

14.2 Détermination d'une partie plus stable du complexe ternaire

Nous avons incubé *PscE:PscF:PscG* avec différentes protéases (trypsine, chymotrypsine, élastase, subtilisine, thermolysine et papaïne) selon des rapports enzyme:protéine de 1:500 et 1:1000 à température ambiante et sur des durées de 30 min à 3h. La digestion est arrêtée en ajoutant du tampon de Laemmli (1x) et en chauffant les échantillons, avant de les faire migrer sur un gel d'acrylamide dénaturant. Parmi elles, la chymotrypsine, l'élastase et la thermolysine n'ont pas affecté le complexe ternaire alors que la subtilisine a entièrement protéolysé le complexe. Seules la papaïne et la trypsine ont conduit à des fragments protéolytiques

stables qui ont pu être analysés par spectrométrie de masse dénaturante et séquençage N-terminal. Pour la suite, nous avons retenu les produits de la protéolyse limitée par la papaïne, plus spécifique et plus reproductible que la digestion par la trypsine.

La papaïne a ainsi permis d'isoler une partie plus stable du complexe ternaire constitué des protéines PscE et PscG dans leur intégralité et de l'extrémité C-terminale de PscF (résidus 55-85). Il est à noter que ces fragments protéolytiques ont également été détectés, parmi d'autres, après coupure par la trypsine.

Ce nouveau complexe $PscE-PscF^{55-85}-PscG$ a été cloné dans le plasmide pET-15b et surexprimé chez *E. coli*. Les trois protéines ont été copurifiées à nouveau en un complexe 1:1:1 et identifiées comme PscE, PscG et $PscF^{55-85}$ par spectrométrie de masse dénaturante et par séquençage N-terminal (figure 14.2).

Nous avons ainsi déterminé un domaine d'interaction entre les partenaires PscE et PscG et une partie du substrat d'exportation PscF nécessaire à la polymérisation, dont la résolution de la structure tridimensionnelle sera très informative pour la détermination des rôles respectifs de PscE et PscG.

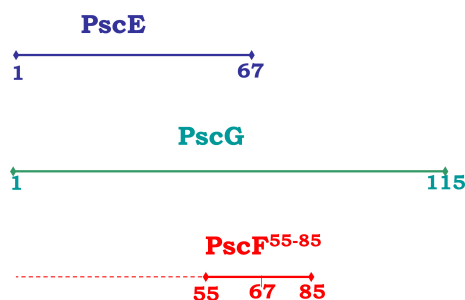


FIG. 14.2 – **Représentation schématique du complexe $PscE:PscF^{55-85}:PscG$.** Il est à noter que les résidus 68-85 de PscF nécessaires à la polymérisation de cette protéine sont présents dans le complexe tronqué.

14.3 Cristallogénèse de $PscE-PscF^{55-85}-PscG$

Après clivage de l'étiquette histidine par la thrombine, des essais de cristallogénèse ont été menés par méthode de diffusion de vapeur en goutte assise et en utilisant les kits de cristallisation Hampton à l'aide du robot Cartesian de l'EMBL (Grenoble). Des premiers cristaux ont ainsi été obtenus en 72 heures en mélangeant

1 μL de solution protéique de *PscE-PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG* à 30 mg/mL avec 1 μL de solution du réservoir (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 M LiSO_4 , 10 mM NiCl_2) à 20°C. Les cristaux ont été reproduits et optimisés manuellement jusqu'à pousser en 48 heures et atteindre un volume de $14.10^4 \mu\text{m}^3$ environ en ajustant la solution de réservoir à 0,1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.6 M LiSO_4 , 10 mM NiCl_2 et en abaissant la concentration de protéines à 20 mg/mL.

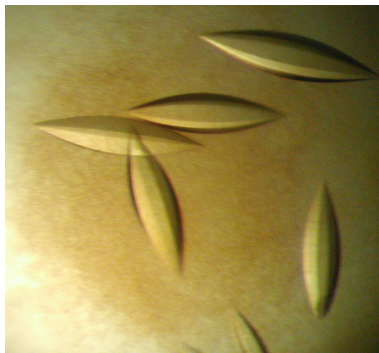


FIG. 14.3 – *Cristaux de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG dans 0.6 M LiSO₄, 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NiCl₂.*

14.4 Collecte des données et indexation

Les données de diffraction ont été collectées dans des conditions cryoprotectantes sur la ligne ID14-eh2 à l'ESRF¹ à 100K et à une longueur d'onde de 0.933Å (<http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/Beamlines/>).

L'indexation a été faite avec Denzo [Sch2002] puis Scalepack [Sch2002]. Les cristaux appartiennent au groupe d'espace $P6_22$. Les statistiques sont rassemblées dans la table 14.1, p. 167.

Le coefficient de Matthews [Mat1968] est calculé comme

$$V_M = \frac{V}{M \times Z} \quad (14.1)$$

où V est le volume de la maille, M le poids moléculaire du complexe ternaire et Z le nombre d'hétérotrimères dans l'unité asymétrique. Le coefficient de Matthews est compris entre 1.6 et 4.0 $\text{\AA}^3/\text{dal}$ pour des cristaux contenant entre 30% et

¹ESRF : European Synchrotron Radiation Facility

75% d'atomes de protéines. Dans notre cas, cela suggère que l'unité asymétrique contiendrait 1 hétérotrimère et le coefficient de Matthews vaudrait $3.475 \text{ \AA}^3/\text{dal}$. Ceci a été confirmé par la résolution de la structure cristallographique. Le pourcentage de solvant peut être calculé par $1 - \frac{1}{V_M}$, il vaut 64% ici.

Les cristaux ont diffracté jusqu'à une résolution de 2.0 \AA . Les statistiques sont présentées dans le tableau 14.1.

14.5 Reconstruction du modèle et affinement

Un jeu de données à 2.2 \AA a été obtenu après trempage d'un cristal dans une solution de 25 mM de Tris-dipicolinate lutétium (atome lourd de la famille des lanthanides) afin d'obtenir un cristal de protéine dans lequel un métal serait accroché et permettrait ainsi le phasage. Ce jeu a été traité de façon anormale afin de déterminer si le complexe de Tris-dipicolinate lutétium s'était fixé, et s'il serait possible de phaser les réflexions avec le signal anomal obtenu. Du signal anomal a en effet été détecté par SHELXD [Sch2002]. Il était étonnamment faible mais a permis la détection de 3 sites de fixation d'atomes lourds par unité asymétrique, ce qui a permis le phasage avec le programme autoSHARP [dlF1997]. Après modification de solvant, ARP/wARP [Mor2003] a été capable de construire automatiquement dans la carte de densité électronique expérimentale 200 des 217 résidus du complexe ternaire.

Puisque nous disposions également d'un jeu de données à 2.0 \AA (non trempé dans la solution de lutétium, mais contenant néanmoins des ions nickel de la solution de cristallisation), nous avons, dans un but pédagogique et aussi pour améliorer la précision du modèle, fait du remplacement moléculaire en injectant les phases du modèle construit précédemment dans le jeu de données collectées à 2.0 \AA , ceci afin d'améliorer la précision du modèle.

Le modèle a ensuite été affiné par la suite CNS [Bru1998] et manuellement avec Coot (www.ysbl.york.ac.uk/~emsley/coot) jusqu'à obtenir des paramètres stéréochimiques corrects en terme d'angles et de longueur de liaisons atomiques, ainsi que des données statistiques satisfaisantes en terme de facteur R ($R_{free}=23.5\%$ et $R=20.7\%$).

Au cours de l'affinement, il s'est avéré que la densité électronique obtenue pour les atomes lourds ne correspondait pas à celle attendue pour le lutétium (beaucoup

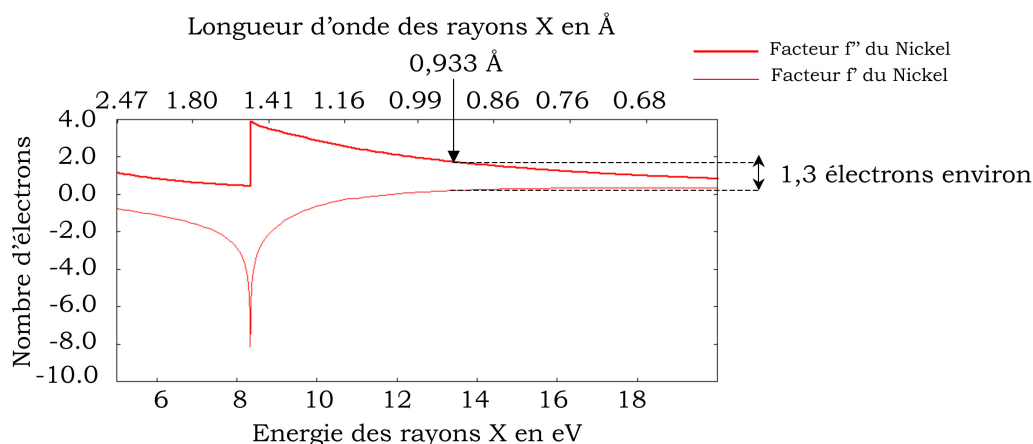


FIG. 14.4 – *Spectre d'absorption théorique du nickel en fonction de l'énergie des rayons X*. Les coefficients f' et f'' sont reportés. A la longueur d'onde à laquelle les données ont été collectées, le f'' ne vaut qu'environ 1,3 électrons (d'après <http://skuld.bmsc.washington.edu/cgi-bin/edgeplots>).

trop faible) mais correspondait bien à la densité électronique pour des ions nickel. De plus, le complexe de Tris-dipicolinate qui aurait dû accompagner le lutétium n'a pas pu être observé sur la carte de densité électronique, et enfin la coordination observée n'était pas celle attendue pour le complexe de Tris-dipicolinate mais correspondait très bien à la coordination d'ions nickel. Ainsi, ce ne sont pas 3 complexes de Tris-dipicolinate lutécium mais 3 ions nickel, provenant de la condition de cristallisation, qui se sont fixés sur la protéine. Ceci explique pourquoi le signal anormal détecté était si faible.

Ce phasage inattendu par méthode SAD loin du seuil d'absorption au Ni qui n'a un facteur $f'' \approx 1,3$ électrons à 0,933 Å, longueur d'onde à laquelle le jeu de données a été collecté (figure 14.4), a été rendu possible par la haute qualité des données en terme de résolution, de mosaïcité et de multiplicité (multiplicité de 18.7 pour le jeu à 2.0 Å, liée à la haute symétrie du groupe d'espace $P6_222$ et à la collecte des données sur 180°). Cette stratégie qui consiste à phaser les réflexions avec des atomes dotés d'un plus faible nombre d'électrons (Nickel, Cuivre) que les atomes lourds classiques (Platine, Or, Mercure) et loin de leur seuil d'absorption a été discutée récemment [Leo2005].

TAB. 14.1 – *Statistiques pour la collecte des données, le phasage et l'affinement de la structure de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG. Les statistiques d'indexation sont celles issues de Scalepack. Les valeurs entre parenthèse sont celles de la dernière tranche de résolution.*

	JEU DE DONNÉES I à 2,2Å	JEU DE DONNÉES II à 2,0Å
COLLECTE DES DONNÉES ET PHASAGE		
Paramètres de maille (Å)	a=b=85.3, c=157.6 $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	a=b=85.3, c=157.6 $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Groupe d'espace	P6 ₂ 22	P6 ₂ 22
Longueur d'onde (Å)	0.933	0.933
Tanche de résolution (Å)	30-2.2	30-2.0
Nombre de réflexions uniques/totales	17829/277755	23598/441275
Complétude (%)	99.6 (99.3)	99.4 (97.8)
Multiplicité moyenne des réflexions	15.6	18.7
R _{sym} (%)	5.1 (25.9)	4.7 (11.37)
I/ σ I	39.9 (13.1)	48.15 (8.9)
Pouvoir de phasage	0.74	
Figure-de-mérite		
Après SHARP (centrique/acentrique)	0.24/ 0.05	
Après modification de solvant	0.88	
AFFINEMENT		
R _{work} /R _{free}		20.7/23.5
Nombre de résidus dans PscE/PscF/PscG		70/32/112
Nombre de molécules d'eau		197
Nombre d'ions Ni ²⁺	3	3
Facteur B moyen (Å ²):		
pour la protéine		37.6
pour le solvant		44.8
Déviatiion r.m.s pour les liaisons (Å)		0.02
Déviatiion r.m.s pour les angles (°)		1.8

Chapitre 15

Description de la structure de PscE:PscF^{55–85}-PscG

La résolution de cette structure nous permet pour la première fois de décrire la structure tridimensionnelle à haute résolution d'un fragment du monomère de l'aiguille de sécrétion de type III, PscF, en complexe avec ses deux protéines partenaires PscE et PscG.

Dans ce chapitre, après une description générale du trimère, la structure de chacune des protéines impliquées sera décrite plus précisément.

15.1 Description générale

Dans le complexe PscE:PscF^{55–85}:PscG, les trois protéines sont majoritairement repliées en hélices α (figure 15.1). PscE est repliée en 2 grandes hélices α antiparallèles (Hb et Hc) précédées d'une petite hélice α (Ha) à l'extrémité N-terminale. Le repliement de PscG en 7 hélices α antiparallèles (H1-H7) est semblable à celui d'un domaine *"tétratricopeptide repeat"* (TPR), bien que PscG ne possède pas la séquence canonique d'un domaine TPR et qu'un tel repliement n'était donc pas attendu. La partie tronquée de PscF présente dans la structure cristallographique, loin d'être complètement étendue comme ce qui avait été proposé par STEBBINS et GALAN [Ste2001] pour les protéines maintenues sous forme monomérique par des protéines chaperonnes, possède une hélice α amphiphile (H) à l'extrémité C-terminale (résidus 67-85) alors que le reste de la protéine visible

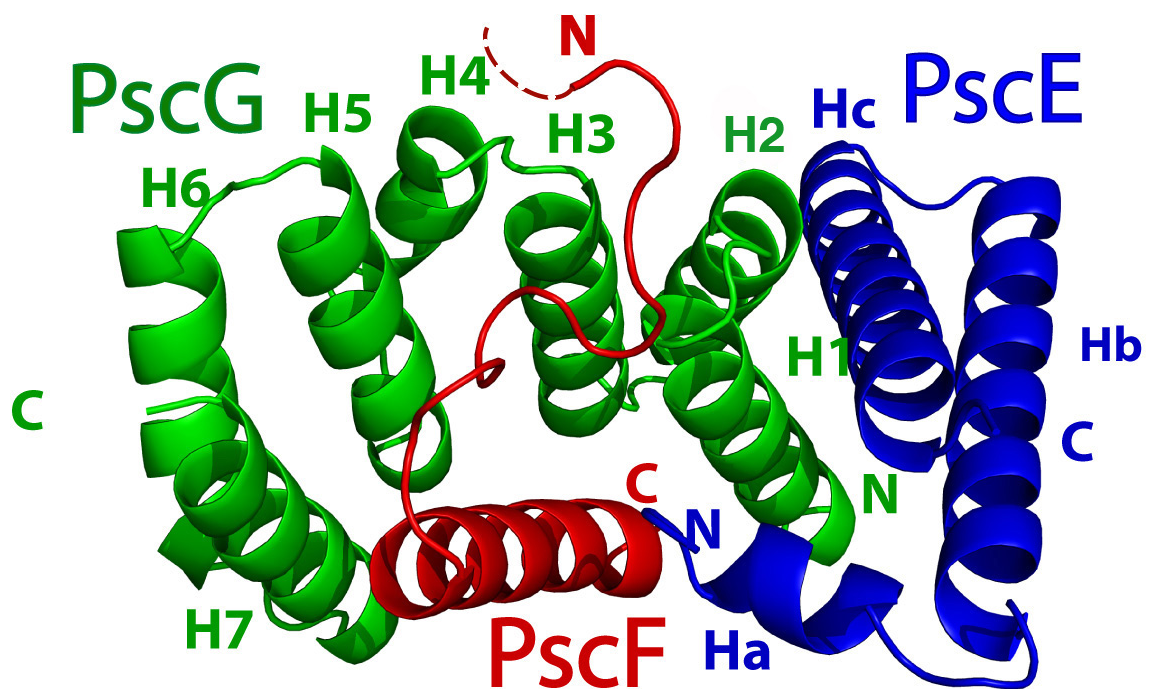


FIG. 15.1 – *Structure cristallographique de PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG (code PDB 2UWJ). PscE est représenté en bleu, PscF en rouge et PscG en vert (d'après QUINAUD et al., 2007 [Qui2007]).*

dans la structure cristallographique (résidus 55-67) est maintenu déplié par des contacts hydrophobes sur la surface de PscG. Il est à noter que de la même façon, les chaperonnes CesT et SigE maintiennent leur effecteur respectif Tir et SigD dans une forme partiellement, et non totalement, dépliée [Luo2001].

15.2 PscG : chaperonne de PscF

Bien que non prédit, PscG a un repliement semblable à celui d'un domaine TPR. Il est en outre possible de superposer la structure de PscG à un autre domaine TPR issu de la structure du TPR1 de la protéine HOP, qui a été résolue par cristallographie aux rayons X [Sch2000]. Un calcul statistique par le logiciel Pymol (<http://pymol.sourceforge.net>) mène à une valeur de rmsd¹ entre les deux structures de 4.7 Å, principalement due aux différences d'angles entre les hélices α (figure 15.3). Ceci valide le repliement semblable à un domaine TPR de PscG.

De tels repliements ont été abondamment décrits chez les organismes eucaryotes et récemment, quelques structures de TPR bactériens ont également été résolues.

PscG, grâce à son repliement de type TPR, offre 2 grandes surfaces pour l'interaction avec ses 2 partenaires ; PscE et PscF. Ces interactions se font en outre par l'intermédiaire de sa face concave en ce qui concerne PscF et de sa face convexe pour PscE.

La zone d'interaction de PscG avec l'hélice C-terminale de PscF est particulièrement étendue ; elle comprend entre autres les leucines 14 et 43 de H1, l'isoleucine 46 de H3, les tryptophanes 73 et 79 et la leucine 76 de H5 ainsi que la phénylalanine 105 et la méthionine 109 de H7 (figure 15.2 p. 172). Tous ces résidus sont effectivement hydrophobes.

Le domaine d'interaction entre PscG et PscE se positionne lui sur la face convexe de PscG, au niveau d'une zone hydrophobe autour des leucines 5, 9 et 12 de H1 ainsi que de l'isoleucine 28, du tryptophane 31 et des leucines 32 et 35 de H2 (figure 15.2 p. 172).

Ainsi PscG, par l'intermédiaire de son domaine TPR, stabilise l'hélice α amphiphile C-terminale de PscF nécessaire à sa polymérisation et bloque les interactions prématurées avec d'autres parties de cette même protéine qui conduiraient

¹rmsd : root mean square deviation

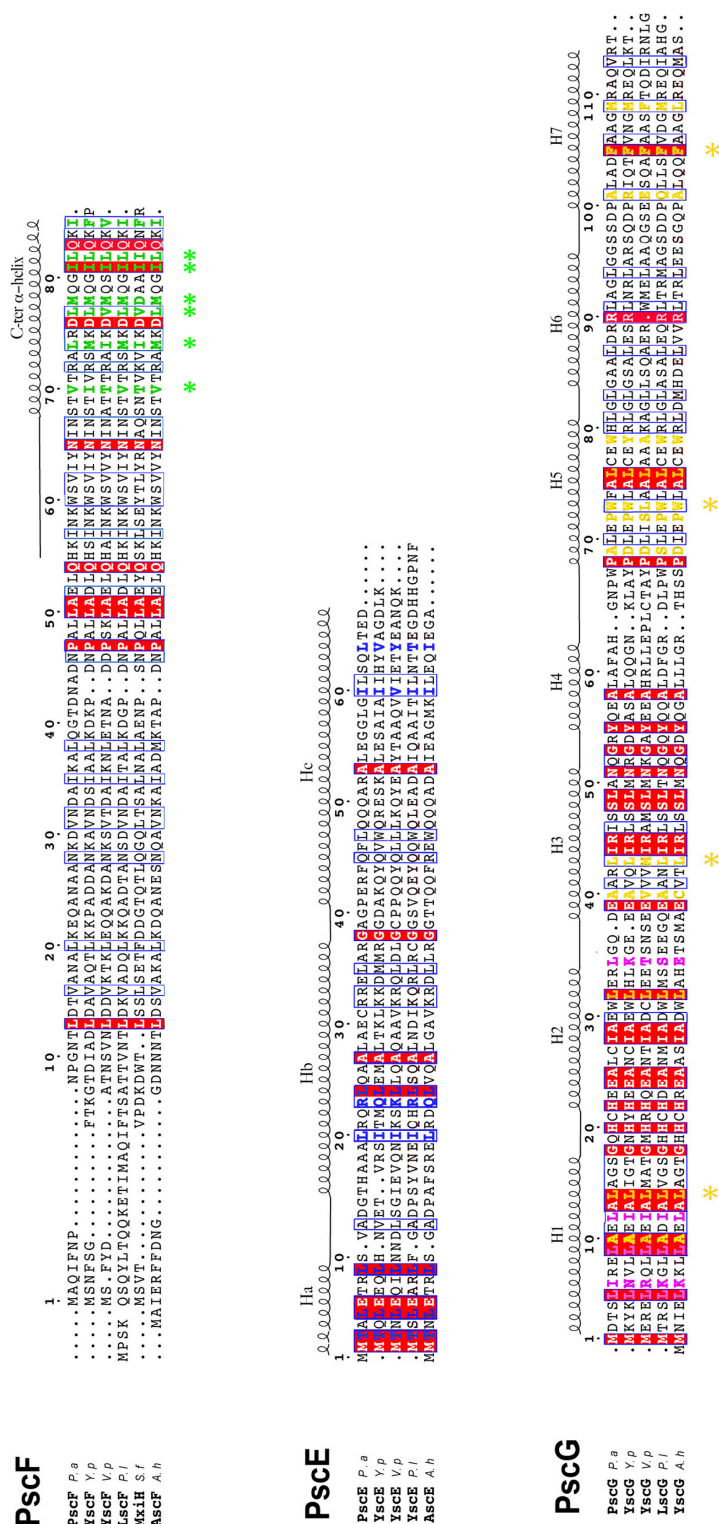


FIG. 15.2 – *Alignement de séquences de PscE, PscF et PscG chez Y. pestis, V. parahaemolyticus, P. luminescens et A. hydrophilia. Les résidus conservés sont sur fond rouge, les résidus homologues encadrés en bleu. Les résidus en vert sont les résidus hydrophobes de l'hélice H de PscF, ceux en bleu les résidus de PscE qui interagissent avec PscG, en violet les résidus de PscG qui interagissent avec PscE et en jaune les résidus de PscG qui interagissent avec PscF. Les étoiles indiquent les résidus qui seront mutés dans le cadre de l'étude fonctionnelle des 3 protéines (d'après QUINAUD et al., 2007 [Qui2007]).*

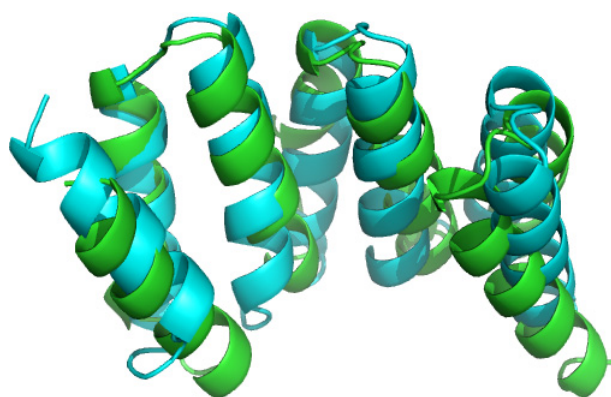


FIG. 15.3 – *Superposition de PscG (bleu) et du domaine TPR1 de HOP (en vert). Les 2 structures du domaine TPR canonique TPR1 et du domaine semblable à un domaine TPR de PscG se superposent, à l'exception des boucles qui lient les hélices entre elles et les angles entre ces hélices.*

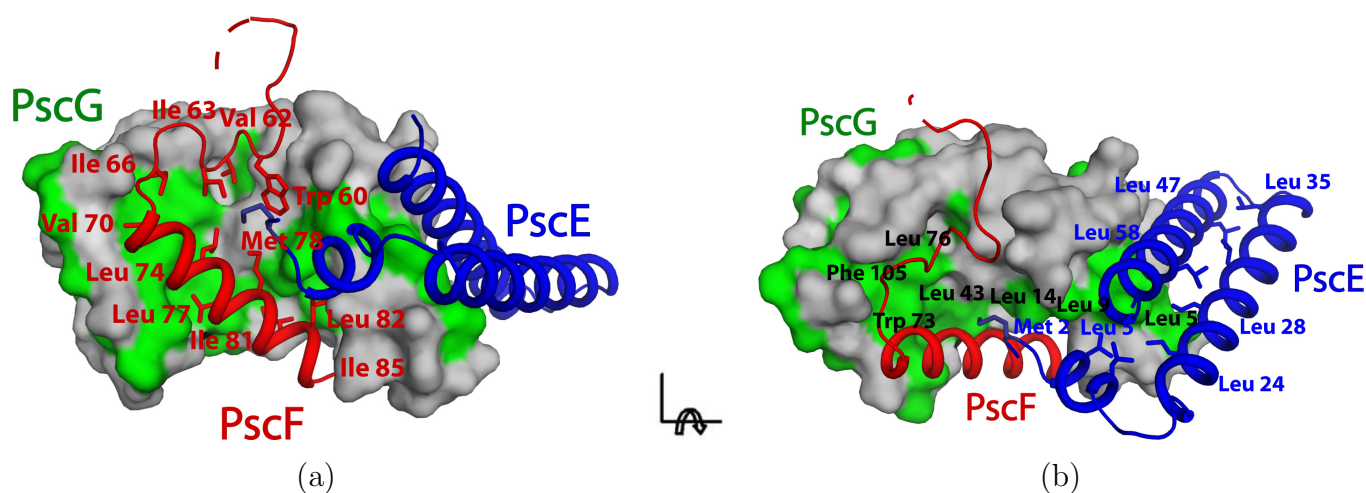


FIG. 15.4 – *Interfaces hydrophobes entre PscG et ses partenaires PscF et PscE. Les résidus indiqués en rouge sont les résidus hydrophobes de PscF qui interagissent avec PscG, les résidus en bleu les résidus hydrophobes de PscE qui interagissent avec PscG et en noir les résidus hydrophobes de PscG qui interagissent avec PscF. PscG interagit avec PscF par l'intermédiaire de la face concave du domaine TPR et avec PscE par l'intermédiaire de la face convexe de PscG. Les plates-formes hydrophobes sont signalées en vert sur la surface de PscG.*

l'agrégation de PscF dans le cytoplasme et la rendraient non fonctionnelle. En maintenant PscF sous une forme monomérique compatible avec sa sécrétion, PscG joue donc le rôle de chaperonne de PscF dans le cytoplasme de *P. aeruginosa*.

Il est par ailleurs à noter que PscG possède les caractéristiques générales des chaperonnes du TTSS, à savoir un faible poids moléculaire (14 kDa) et un point isoélectrique acide (4.8). Ces caractéristiques ne sont en outre pas remplies pour PscE qui possède un point isoélectrique neutre (7.8).

15.3 PscE, agent stabilisateur de PscG

Dans le complexe ternaire, PscE n'interagit avec PscF que par le biais d'un unique résidu (figure 15.5-a). En effet, la méthionine 2 de PscE pointe vers une cavité principalement hydrophobe formée par le tryptophane 60, l'isoleucine 63, l'arginine 75 et la méthionine 78 de PscF.

D'autre part, les hélices Ha, Hb et Hc de PscE interagissent avec les deux hélices H1 et H2 de PscG par l'intermédiaire de contacts hydrophobes qui impliquent entre autres les leucines 5, 9, 24, 28, 35, 47 et 58 de PscE ainsi que les leucines 5, 20, 24, 28, 35, 47 et 63 de PscG (figure 15.5-b, figure 15.2 p. 172).

Ainsi, dans la structure tridimensionnelle du complexe tronqué, PscE n'interagit que de façon limitée avec PscF⁵⁵⁻⁸⁵, ce qui ne permet pas de définir complètement la fonction de PscE, et en particulier ne justifie pas la présence de deux protéines distinctes pour le maintien de PscF sous forme monomérique dans le cytoplasme bactérien.

Une hypothèse est que PscE pourrait être impliquée dans les processus d'adressage du complexe cytoplasmique à la base de l'injectisome de sécrétion et dans la sécrétion de PscF. PscE pourrait également interagir avec la partie N-terminale de PscF qui est absente du complexe tronqué.

In vitro, PscG surexprimée seule est très peu stable et présente de nombreux sites de coupures internes. Elle est stabilisée par PscE avec qui elle forme un complexe de stœchiométrie 1:1. Une fonction de PscE est donc de stabiliser PscG, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par dénaturation thermique (chapitre 13). De façon plus générale, PscE est nécessaire à la formation du complexe ternaire PscE:PscF:PscG dans le cytoplasme de *P. aeruginosa* et donc à la cytotoxicité de la bactérie.

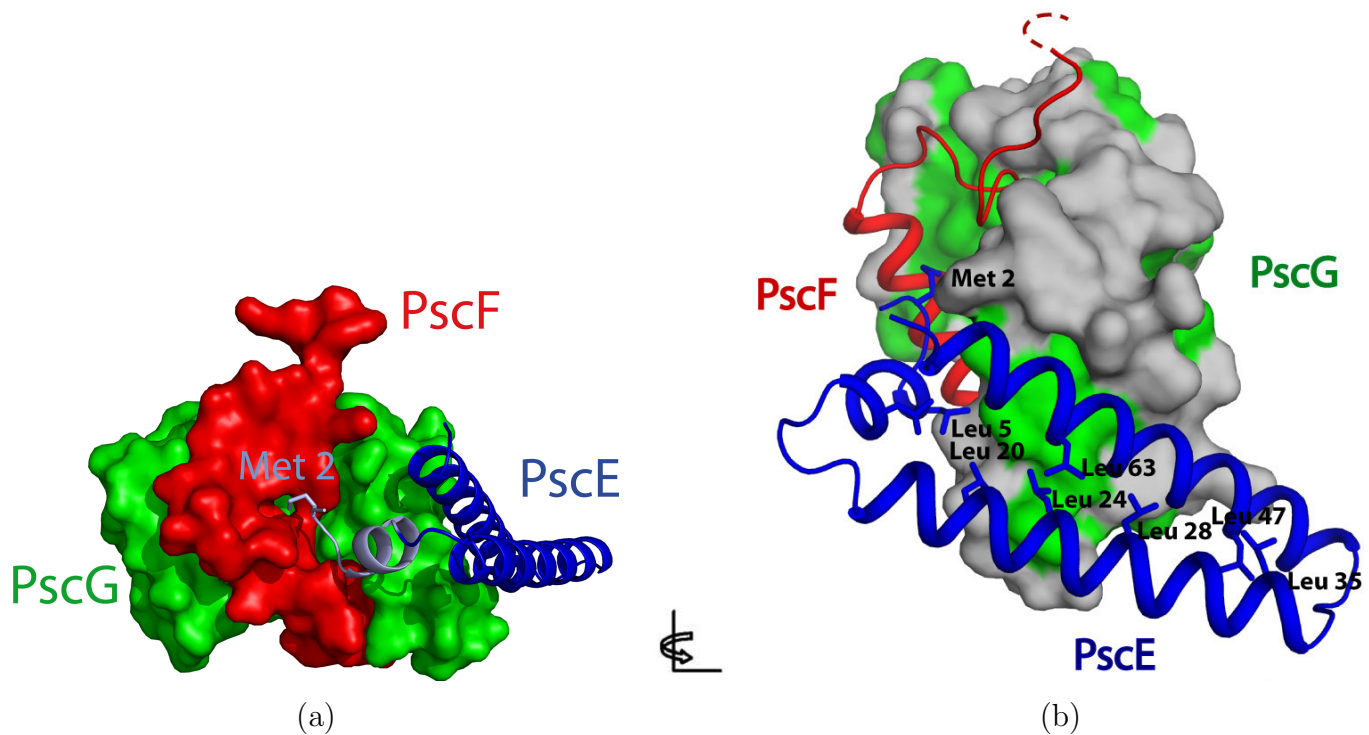


FIG. 15.5 – *Interactions de PscE avec ses partenaires PscF et PscG.* (a) Interaction entre PscF et PscE par l'intermédiaire d'une unique méthionine ; la méthionine 2 de PscE. (b) Large plate-forme hydrophobe (en vert) entre PscE et les hélices H1 et H2 de PscG.

15.4 PscF

L'hélice α amphiphile C-terminale de PscF (H) est fondamentale pour la polymérisation de la protéine entière puisqu'un mutant de PscF délété de cette hélice est incapable de polymériser et se comporte comme un monomère en chromatographie d'exclusion de taille (chapitre 12). La partie C-terminale de PscF présente dans la structure du complexe ternaire comprend l'hélice amphiphile H (résidus 67-85) de 25 Å de long (figure 15.6-b) précédée d'une partie étendue (résidus 55-67). Ainsi et de façon remarquable, PscF n'est pas maintenue complètement dépliée par la chaperonne PscG ; l'hélice H est parfaitement repliée dans le complexe, et le caractère amphiphile de cette hélice est garanti par la zone centrale concave hydrophobe de PscG à l'intérieur de laquelle sont enfouis les résidus hydrophobes de l'hélice H.

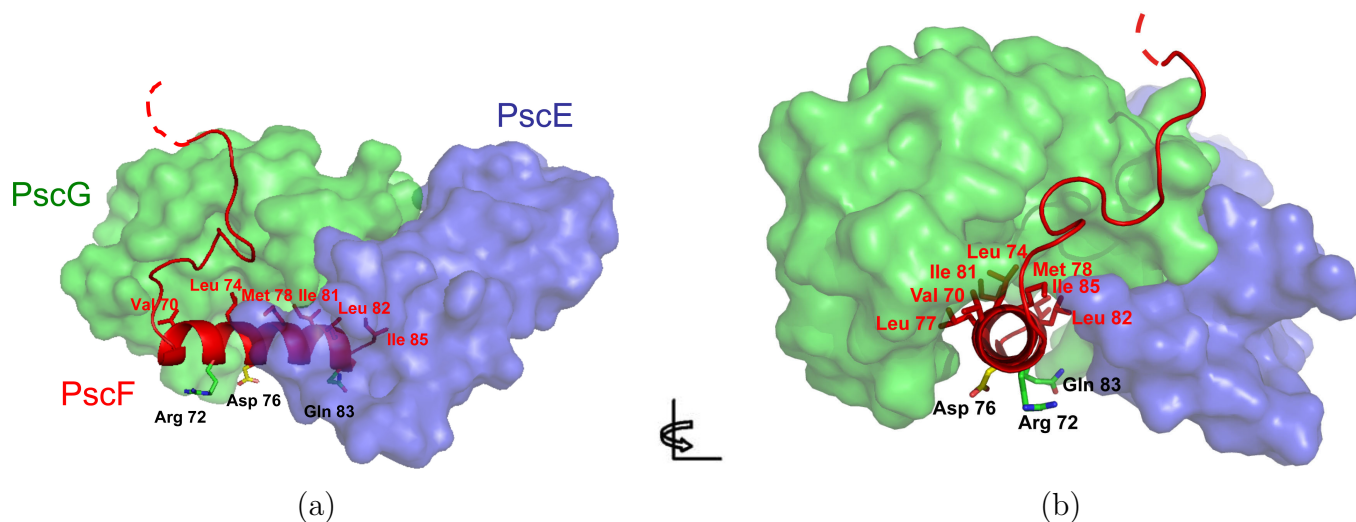


FIG. 15.6 – *Hélice amphiphile C-terminale de PscF et son interaction avec la surface concave du domaine TPR de PscG. Les vues (a) et (b) sont liées par une rotation de 90°. (a) Les résidus hydrophobes de l'hélice H (en rouge) se répartissent tout le long de l'hélice. (b) Les résidus hydrophobes pointent vers l'intérieur de la zone centrale concave hydrophobe de PscG alors que les résidus chargés (en noir) pointent vers l'extérieur du complexe.*

La face hydrophobe de l'hélice H comprend notamment la valine 70, les leucines 77 et 74, la méthionine 78, l'isoleucine 81, la leucine 82 et enfin l'isoleucine 85. Ces

résidus sont distribués tout le long de l'hélice H (figure 15.6-a), ce qui crée une large interface hydrophobe tout le long de cette hélice. Conformément à ce qui a déjà été décrit chez le flagelle et le système de sécrétion de type IV, avec lesquels le système de sécrétion de type III possède des homologies, nous pouvons supposer que l'interface hydrophobe de l'hélice H est impliquée dans la polymérisation de PscF pour former l'aiguille. De telles interactions hydrophobes ont en outre été mises en évidence chez *S. flexneri* [Dea2006].

En outre, un calcul simple permet de calculer le pourcentage de la surface de l'hélice H qui est enfouie dans PscG (les surfaces sont calculées avec le logiciel Get Area 1.1 (http://pauli.utmb.edu/cgi-bin/get_a_form.tcl, disponible en ligne). La surface de PscG mesure 6599 Å², celle de l'hélice H mesure 1879 Å² et celle de la réunion de PscG et H mesure 6941 Å². Ainsi la surface enfouie entre l'hélice H et PscG se calcule selon :

$$\text{Surface enfouie} = \frac{\text{aire}(\text{PscG}) + \text{aire}(\text{H}) - \text{aire}(\text{PscG} \cup \text{H})}{2} \quad (15.1)$$

Ici, 41% de la surface de l'hélice H est enfouie dans PscG, ce qui correspond bien à la caractéristique d'une hélice α amphiphile qui possède des résidus hydrophobes d'un côté (enfouis dans ce complexe) et des résidus hydrophiles de l'autre (exposés).

En face des résidus hydrophobes de H qui sont alignés d'un côté de l'hélice, des résidus chargés pointent, eux, vers l'extérieur du complexe (figure 15.6-b). Il s'agit en particulier de l'aspartate 76 conservée chez d'autres bactéries (figure 16.2), l'arginine 72 et la glutamine 83. Ces résidus chargés pourraient se positionner à l'intérieur de l'aiguille assemblée, ce qui faciliterait la diffusion rapide des effecteurs dépliés présentant de larges zones hydrophobes exposées.

L'hélice H est précédée par 13 résidus dans le fragment de PscF ; ceux ci sont maintenus dans une conformation étendue par des contacts hydrophobes impliquant le tryptophane 60, la valine 62 et les isoleucines 63 et 66 de l'hélice H et des résidus de surface de PscG (leucines 14, 59 et 76, phénylalanine 305).

Ces résidus sont néanmoins prédits repliés en hélice α par les programmes de prédiction de structure secondaire (Jpred : <http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>, PSIPred : <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). De plus,

dans les structures des monomères de BsaL chez *Burkholderia pseudomallei* et MxiH chez *S. flexneri* [Zha2006, Dea2006], les résidus analogues sont effectivement repliés en hélice α . Ainsi nous pouvons supposer que c'est l'interaction de PscG avec les résidus 55-67 de PscF observés dans la structure ou la délétion des résidus 1-54 de PscF qui empêche les résidus 55-67 de PscF de se replier sous forme d'hélices, mais que dans la forme polymérisée ces derniers sont effectivement repliés en hélice α .

La conformation étendue des résidus 55-67 de PscF peut, en outre, être importante pour le passage des monomères à travers l'aiguille puisque l'étroitesse du canal au centre de l'aiguille (diamètre interne d'environ 20Å [Blo2001, Cor2003]) ne permet pas le passage d'une protéine complètement repliée.

Chapitre 16

Étude des rôles de PscE, PscF et PscG

Afin d'exploiter au mieux les informations présentes dans la structure cristallographique, nous avons, pour chaque protéine, étudié sur la base de mutagenèse dirigée des résidus ou ensembles de résidus qui nous ont semblé jouer un rôle majeur pour la stabilité ou la fonctionnalité du complexe, ou encore vis-à-vis du processus de polymérisation de l'aiguille en ce qui concerne PscF. Ces travaux seront décrits dans ce chapitre. Les constructions ont été faites en étroite collaboration avec un chercheur de l'équipe d'Andréa DESSEN ; Viviana JOB.

16.1 Étude fonctionnelle de PscF^{55–85}

PscF^{55–85} est repliée en une hélice α amphiphile C-terminale notée H (résidus 67-85) précédée par une partie dépliée. Dans cette section, nous étudierons les rôles des résidus hydrophobes et polaires de l'hélice H.

16.1.1 Étude fonctionnelle des résidus hydrophobes de l'hélice H de PscF

Afin de mettre en évidence l'importance des résidus hydrophobes de l'hélice H de PscF, ces derniers ont été mutés en lysines, résidus chargés positivement, aussi bien dans le vecteur pET-15b pour une étude *in vitro* que dans pIApG pour

des études de cytotoxicité sur les souches mutées. Les mutations ont été effectuées par paires de résidus alignés le long de l'hélice H (figure 16.1), créant ainsi des doubles mutants *PscF* V70K/L77K, *PscF* L74K/I81K et *PscF* M78K/L82K, ceci afin d'accroître l'effet de la mutation par rapport à des simples mutants. Leur taille, leur faculté de polymérisation et leur stabilité ont été étudiées *in vitro*. De plus, le pouvoir cytotoxique de la souche CHA délétée de *pscF* et complémentée par chacun des mutants a également été examiné.

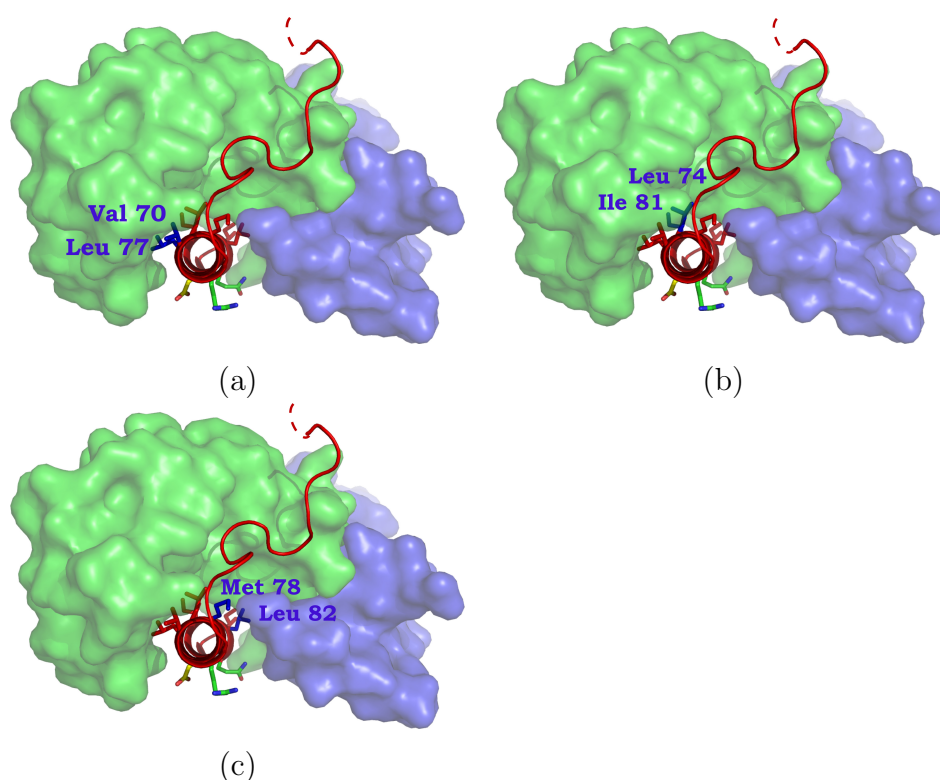


FIG. 16.1 – *Mutations par paires de résidus hydrophobes alignés dans l'hélice H de PscF*. Ces mutations permettent d'étudier, tour à tour, l'effet de l'altération du caractère hydrophobe de l'hélice H dans 3 directions caractéristiques. (a) Positions de la valine 70 et la leucine 77 de *PscF*. (b) Positions de la leucine 74 et l'isoleucine 81 de *PscF*. (c) Positions de la méthionine 78 et la leucine 82 de *PscF*.

En outre, ces résidus mutés sont pour la plupart conservés ou homologues chez *Y. pestis*, *V. parahaemolyticus*, *P. luminescens*, *S. flexneri*, *V. parahaemolyticus* et *A. hydrophilia* (à l'exception de la valine 70 de *PscF* à laquelle correspond une

thréonine chez *V. parahaemolyticus* et *S. flexneri*), ce qui confère de l'importance à ces résidus et laisse supposer que ceux-ci sont impliqués dans la fonctionnalité de PscF (figures 16.2, figure 15.2 p. 172).

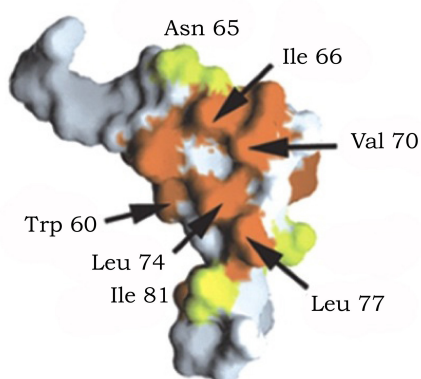


FIG. 16.2 – *Conservation des résidus hydrophobes de l'hélice amphiphile de PscF chez P. aeruginosa, Y. pestis, P. luminescens S. flexneri, V. parahaemolyticus et A. hydrophilia. Visualisation des résidus mutés sur une représentation de la surface de PscF. Les résidus identiques sont colorés en jaune et les résidus homologues en orange.*

Les résidus hydrophobes de l'hélice H sont impliqués dans la polymérisation de la fibre.

Les doubles mutants PscF V70K/L77K, PscF L74K/I81K et PscF M78K/L82K ont été purifiés *in vitro*. L'analyse par chromatographie d'exclusion de taille a révélé qu'ils ont une taille intermédiaire entre celle de PscF sauvage qui est éluee dans le volume vide d'une colonne de filtration sur gel et celle de la forme monomérique PscF¹⁻⁶⁷ (figure 16.3-a). Ainsi, ces mutations ont affecté la capacité de polymérisation des mutants de PscF qui ne peuvent alors que former des assemblages de plus petite taille que la forme sauvage de PscF ; les résidus hydrophobes mutés sont impliqués dans la polymérisation de PscF.

Afin de caractériser plus précisément les oligomères des mutants de PscF, les doubles mutants de PscF ont été observés par microscopie électronique par coloration négative, ainsi que la souche sauvage en tant que contrôle positif d'une polymérisation normale (figure 16.3-b). Ce travail a été réalisé en collaboration

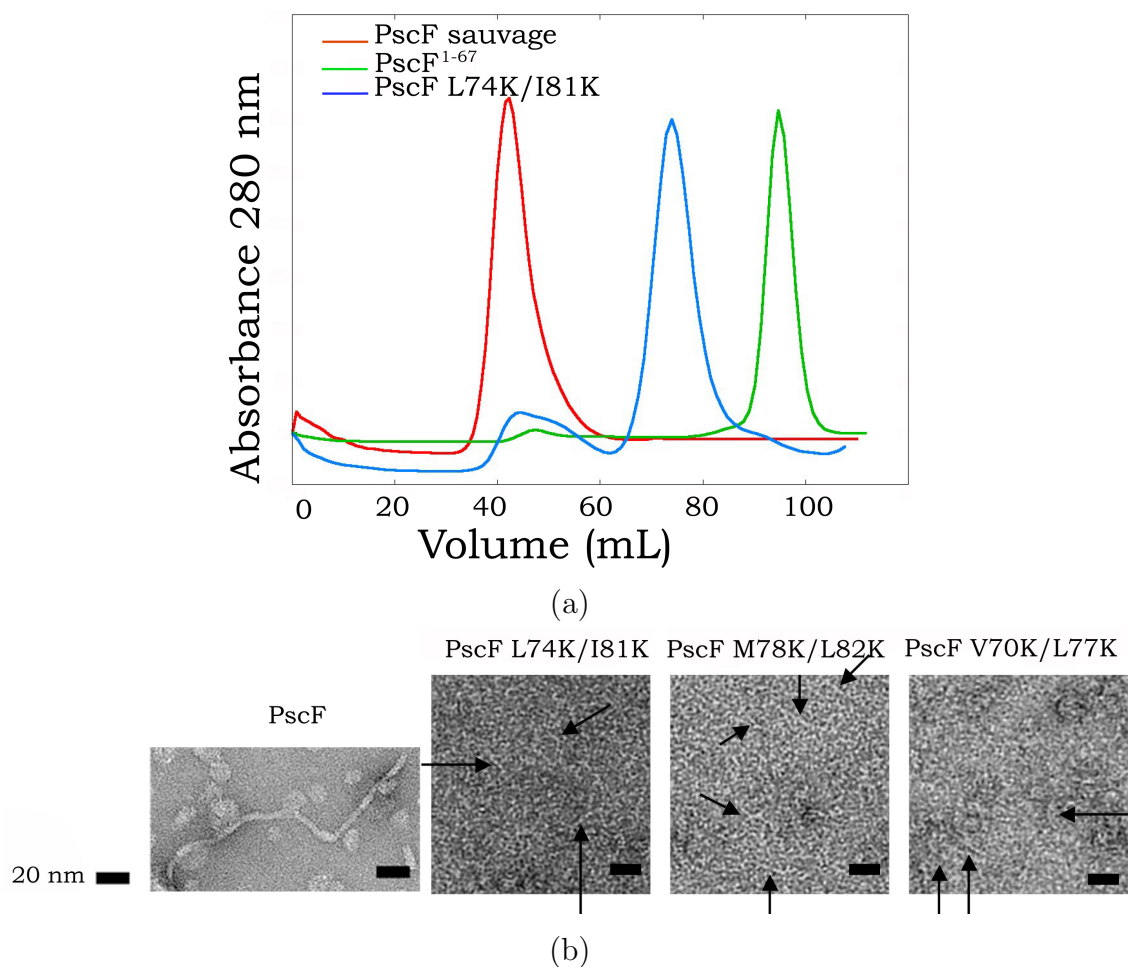


FIG. 16.3 – *Les résidus hydrophobes de l'hélice H sont impliqués dans la polymérisation de PscF.* (a) En chromatographie par exclusion de taille sur colonne Hiloal Superdex 200, les mutants (en bleu) sont élués comme des assemblages de taille intermédiaire entre la forme polymérisée (en rouge) et la forme monomérique (en vert) de PscF. (b) En microscopie électronique, les assemblages des mutants apparaissent comme des fibrilles, et non comme les fibres longues et larges observées avec la souche sauvage. Cela montre, là encore, un défaut de polymérisation.

avec Guy SCHOEHN du CISB, Grenoble (Projet européen en Biologie Structurale Intégrée). Cela a mis en évidence qu'alors que la forme sauvage de PscF polymérise en de longues fibres relativement épaisses, les mutants de PscF ne peuvent former que des fibrilles, beaucoup plus fines et souvent plus courtes. Ainsi, les mutations des résidus hydrophobes de l'hélice H en lysines affectent l'assemblage en fibres de PscF, ne permettant pas sa polymérisation correcte notamment en ce qui concerne l'assemblage des monomères.

Les résidus hydrophobes de l'hélice H sont impliqués dans la stabilité de la fibre.

La stabilité des mutants de PscF a ensuite été étudiée par dénaturation thermique suivie par spectroscopie de dichroïsme circulaire afin de compléter leur étude biophysique.

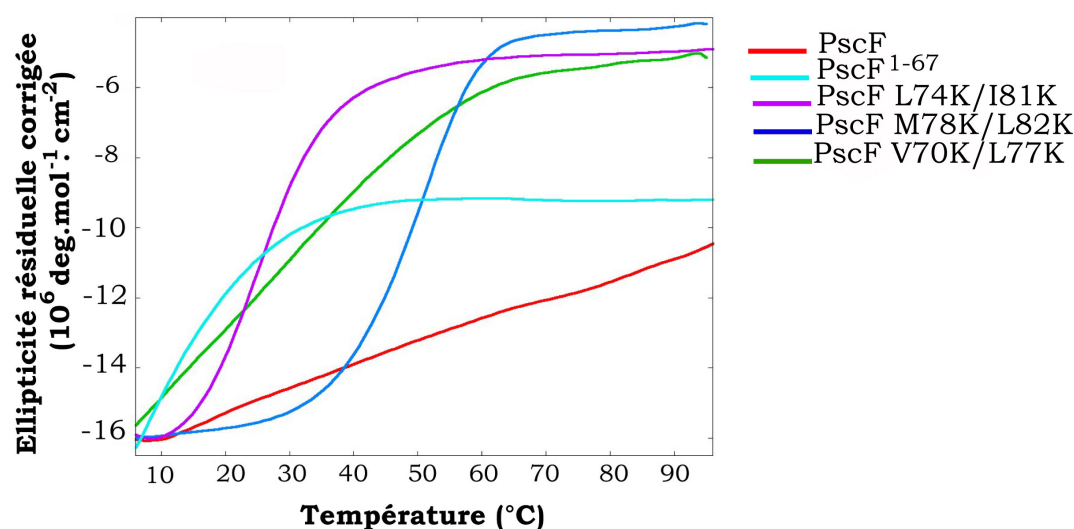


FIG. 16.4 – *Les mutations dans la zone hydrophobe de l'hélice H diminuent la stabilité de la fibre formée. Alors que la forme sauvage de PscF est très stable et ne subit pas de transition thermique, les doubles mutants PscF L74K/I81K et PscF M78K/L82K se déplient à une température de fusion de 30°C et 50°C environ respectivement. Le double mutant PscF V70K/L77K commence lui à se dénaturer dès 4°C. Il est ainsi encore moins stable, de même que la forme monomérique PscF¹⁻⁶⁷.*

L'analyse des courbes obtenues (figure 16.4) montre que les doubles mutants

présentent tous une stabilité intermédiaire entre celle de la forme sauvage de PscF (très stable) et celle de la forme monomérique (très peu stable). En effet, alors que PscF sauvage assemblé en fibres ne subit pas de transition thermique, les doubles mutants PscF M78K/L82K et PscF L74K/I81K se déplient à 50°C et 30°C respectivement. Le double mutant PscF V70K/L77K est encore moins stable et commence à se dénaturer dès 4°C. La forme monomérique PscF¹⁻⁶⁷ se déplie elle aussi dès 4°C et son dépliement est plus rapide que celui de PscF V70K/L77K. Ce résultat va dans le sens des conclusions précédentes concernant la taille des assemblages de ces mêmes mutants. Plus le processus de polymérisation est de grande ampleur, plus la forme assemblée est stable. La polymérisation entraîne donc une stabilisation de la fibre, résultat en accord avec ce qui a été montré pour PrgI et MxiH [Dar2006].

Les résidus hydrophobes de l'hélice H sont impliqués dans la cytotoxicité de *P. aeruginosa*

Afin de compléter les études biophysiques réalisées *in vitro*, pour chacune des mutations étudiées, une souche CHA délétée de *pscF* a été complémentée par un plasmide portant le gène *pscF* muté. La cytotoxicité des souches résultantes a été mesurée à l'iRTSV (laboratoire d'Ina ATTRÉE) par leur capacité à infecter la lignée cellulaire de macrophages J774. Les résultats sont présentés sur la figure 16.5.

Ces études montrent que les doubles mutants dans la zone hydrophobe de l'hélice H sont également faiblement cytotoxiques. Ainsi, de la même façon qu'*in vitro* ces mutations affectent l'assemblage et la stabilité des fibres, *in vivo*, elles affectent la formation d'une aiguille fonctionnelle permettant à *P. aeruginosa* d'infecter des macrophages.

Ces résultats concourent donc tous à montrer que les résidus hydrophobes conservés de l'hélice amphipathique C-terminale de PscF sont nécessaires à la polymérisation d'une aiguille de type III fonctionnelle.

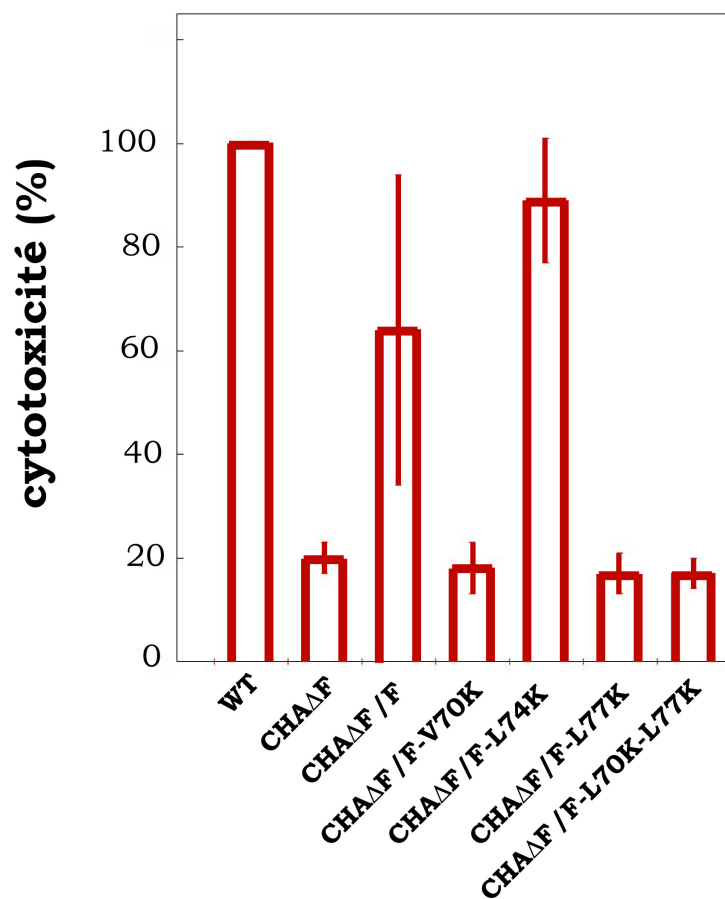


FIG. 16.5 – Les mutations de la valine 70 et de la leucine 77 de l'hélice H en lysines diminuent la cytotoxicité de *P. aeruginosa* vis-à-vis de la lignée cellulaire de macrophages J774.

16.2 Rôle du domaine concave hydrophobe de PscG

Le domaine hydrophobe concave de PscG protège les résidus hydrophobes de l'hélice C-terminale de PscF, impliqués dans la polymérisation, d'une polymérisation prématurée. Afin d'étudier le rôle de ces résidus hydrophobes de PscG, la leucine 14 de H1, la leucine 43 de H3, le tryptophane 73 de H5 et la phénylalanine 105 de H7 ont été mutés en sérine (résidu polaire et n'imposant pas de gêne stérique qui pourrait perturber l'interaction avec PscF) sur la base des simples et doubles mutants PscE:PscF:PscG L14S/L43S, PscE:PscF:PscG L43S/W73S et PscE:PscF:PscG L43S/F105S, dans les vecteurs pIApG et pET-15b (à l'exception du mutant PscE:PscF:PscG L14S/L43S qui n'a pas été construit dans pET-15b). De plus, et comme dans le cas des mutations réalisées dans la zone hydrophobe de PscF, ces résidus, à l'exception de la leucine 43, sont conservés chez d'autres bactéries de référence (figure 16.6, figure 15.2 p. 172), ce qui appuie le rôle important de ceux-ci pour la fonctionnalité du T3SS.

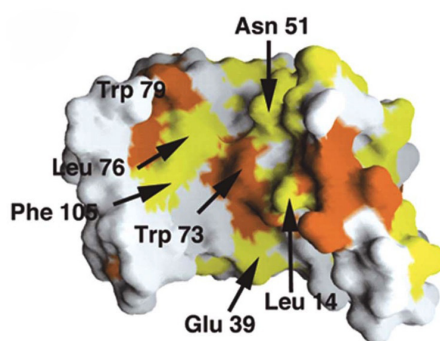


FIG. 16.6 – *Conservation des résidus du domaine concave hydrophobe de PscG chez P. aeruginosa, Y. pestis, V. parahaemolyticus, P. luminescens et A. hydrophilia. Les résidus identiques sont colorés en jaune et les résidus homologues en orange.*

16.2.1 Rôle de stabilisation du complexe ternaire

La capacité des formes mutées de PscG à complexer PscE et PscF en un complexe ternaire stable a tout d'abord été étudiée *in vitro*. Pour cela, les complexes ternaires contenant les versions mutées de PscG ont tout d'abord été surexprimées et purifiées, puis leur stabilité a été étudiée par dénaturation thermique suivie par spectroscopie de dichroïsme circulaire.

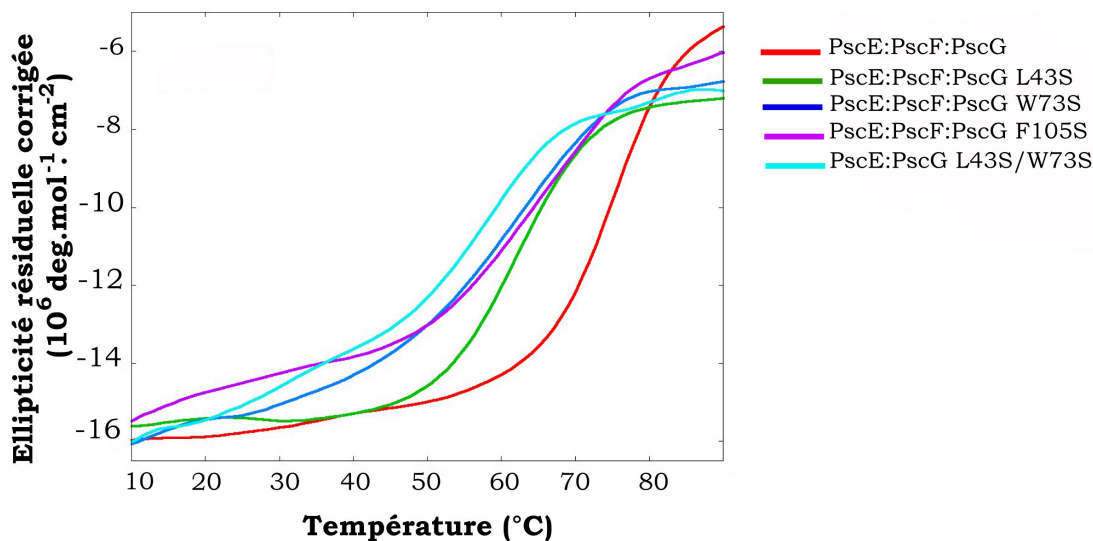


FIG. 16.7 – *Effets des simples et doubles mutations dans la zone centrale concave hydrophobe de PscG sur la stabilité des complexes formés avec ses partenaires.* Les complexes ternaires impliquant les trois simples mutants présentent des températures de fusion plus basses que la forme sauvage du complexe, ce qui montre qu'ils sont moins stables. PscG L43S/W73S ne peut former qu'un complexe binaire avec PscE et est encore moins stable.

Dans le cas des simples mutants PscE:PscF:PscG L14S, PscE:PscF:PscG L43S et PscE:PscF:PscG F105S, le complexe ternaire a pu être purifié et mis en évidence par spectrométrie de masse dénaturante. Ainsi les formes simplement mutées de PscG peuvent encore former un complexe avec les deux autres partenaires. Les spectres de dichroïsme circulaire des complexes mutés sont caractéristiques d'un repliement en hélices α (non montré) ; les mutations réalisées n'empêchent pas le repliement du complexe ternaire. Cependant, les courbes de dénaturation thermique suivie par spectroscopie de dichroïsme circulaire des mutants présentent

une température de fusion inférieure à celle de la forme sauvage du complexe ternaire (figure 16.7); les simples mutations de ces résidus hydrophobes de *PscG* destabilisent donc les complexes ternaires formés, sans néanmoins empêcher leur formation.

Les doubles mutants *PscG* L43S/W73S et *PscG* L43S/F105S ne sont en revanche pas capables de former un complexe stable avec *PscE* et *PscF*; seuls des complexes binaires *PscE*:*PscG* L43S/W73S et *PscE*:*PscG* L43S/F105S ont pu être purifiés. Dans ces cas, la modification importante de la zone centrale concave hydrophobe de *PscG* qui constitue la surface d'interaction entre *PscG* et *PscF* ne permet donc plus la complexation de ces 2 protéines. Cependant, le spectre de dichroïsme circulaire révèle encore une fois un complexe correctement replié en hélices α . Comme ce qui était attendu, l'étude de stabilité du complexe binaire *PscE*:*PscG* L43S/W73S a montré qu'il est encore moins stable que les complexes ternaires obtenus précédemment avec les simples mutants de *PscG*. En effet les trois protéines se co-stabilisent au sein du complexe ternaire [Qui2005].

16.2.2 Rôle de ces résidus hydrophobes vis à vis de la cytotoxicité de *P. aeruginosa*

L'effet de ces mutations réalisées au niveau de la zone centrale concave hydrophobe de *PscG* en termes de cytotoxicité a également été étudié *in vivo* chez *P. aeruginosa* par l'équipe d'Ina ATTRÉE. Pour cela, des souches CHA délétées de *pscG* (ΔG) ont été complémentées par des plasmides contenant les gènes mutés de *pscG* étudiés précédemment. Les résultats sont présentés sur la figure 16.8.

Les simples mutations des leucines 14 ou 43 en sérines n'affectent pas ou peu la cytotoxicité, alors que dans le cas des simples mutations du tryptophane 73 ou de la phénylalanine 105 en sérines, la cytotoxicité observée est de l'ordre de 40% de celle de la souche sauvage. Ces 2 derniers résidus semblent donc être plus importants que les deux premiers pour la formation d'un complexe ternaire fonctionnel. Les résultats obtenus dans le cadre des doubles mutations confortent cette hypothèse puisque la souche CHA délétée en *pscG* et complémentée par *pscG* L14S/L43S est encore cytotoxique à hauteur de 40% de la souche sauvage, alors que les deux souches CHA délétées en *pscG* et complémentées par *pscG* L43S/W73S ou *pscG* W73S/F105S ne le sont plus.

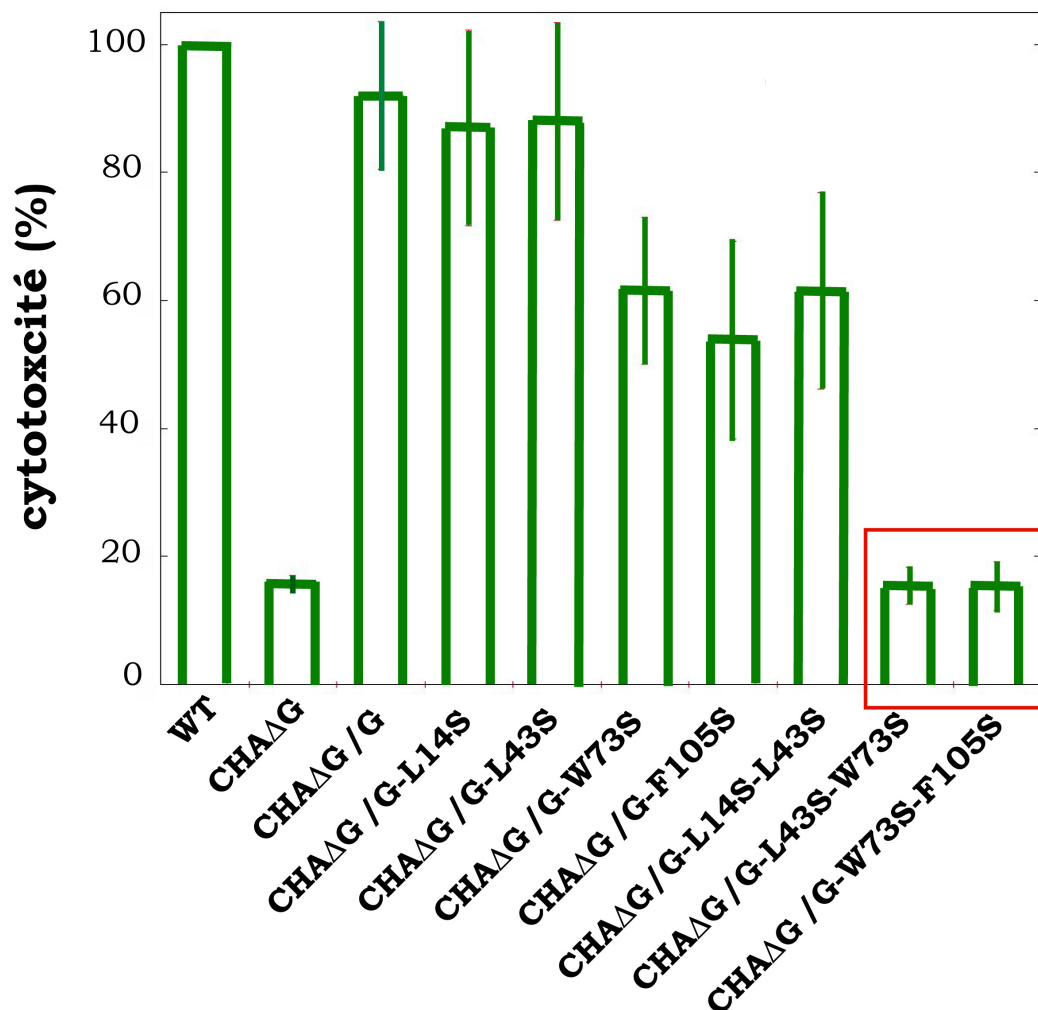


FIG. 16.8 – *Effets des simples et doubles mutations dans la zone centrale concave hydrophobe de PscG sur la cytotoxicité de P. aeruginosa envers la lignée cellulaire de macrophages J774. Les mutations des leucines 14 ou 43 n'affectent pas ou peu la cytotoxicité. En revanche, les mutations du tryptophane 73 ou de la phénylalanine 105 entraînent une baisse de cytotoxicité de 40% environ et ce phénomène est encore plus significatif dans le cas des doubles mutants PscG L43S/W73S et PscG W73S/F105S (colonnes encadrées en rouge), où les bactéries sont peu cytotoxiques.*

Ainsi l'hydrophobicité de la zone centrale concave de PscG dans laquelle est enfouie l'hélice amphiphile H de PscF est nécessaire à la complexation de PscF par PscG et PscE, et par conséquent, à la formation du complexe ternaire fonctionnel nécessaire à la cytotoxicité de la bactérie.

16.3 Étude fonctionnelle de l'hélice Ha de PscE

Dans la structure du complexe PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG, l'hélice Ha de PscE, et plus particulièrement la méthionine 2, pointe dans une cavité de PscF (figure 15.5, p. 175). C'est en outre la seule interaction entre les partenaires PscE et PscF. De plus, la séquence correspondant à l'hélice Ha est particulièrement bien conservée chez d'autres bactéries (figure 15.2 p. 172). Cette observation nous a conduit à étudier la fonction possible de cette méthionine, ou plus globalement de l'hélice Ha, afin d'enrichir notre connaissance sur la fonction de PscE, et par là justifier le besoin pour PscF d'être pris en charge par 2 protéines partenaires distinctes.

Pour cela, *in vivo*, dans l'équipe d'Ina ATTRÉE, des souches CHA délétées en *pscE* ont été complémentées par un plasmide portant *pscE*³⁻⁶⁷ ou *pscE*¹²⁻⁶⁷ afin de tester l'importance pour la cytotoxicité de la méthionine 2 ou de l'hélice Ha respectivement. Ces souches se sont révélées cytotoxiques à même hauteur que la souche sauvage (figure 16.9-a), l'hélice Ha ne joue donc au plus qu'un rôle mineur par rapport à la cytotoxicité.

Afin de confirmer cette hypothèse, la formation d'un complexe ternaire stable a été étudiée *in vitro*. De la même façon, il a été possible de copurifier les trois protéines du complexe PscE¹²⁻⁶⁷-PscF-PscG ; la délétion de l'hélice Ha n'a donc pas empêché la formation du complexe ternaire. La température de fusion de ce complexe a été déterminée par dénaturation thermique suivie par spectroscopie de dichroïsme circulaire ; celle-ci est peu différente de celle de la forme sauvage du complexe ($T_{mPscEFGwt}=75^{\circ}\text{C}$ et $T_{mPscEFG\Delta Ha}=70^{\circ}\text{C}$, les deux protéines ayant été préparées en même temps dans les mêmes tampons, et les courbes ayant été acquises le même jour) (figure 16.9-b).

Ainsi, bien que dans la structure du complexe ternaire PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵:PscG la position de l'hélice Ha, et plus précisément celle de la méthionine 2, est remarquable, leur fonction n'a pas pu être mise en évidence en terme de stabilité du complexe ternaire, ni en terme de cytotoxicité.

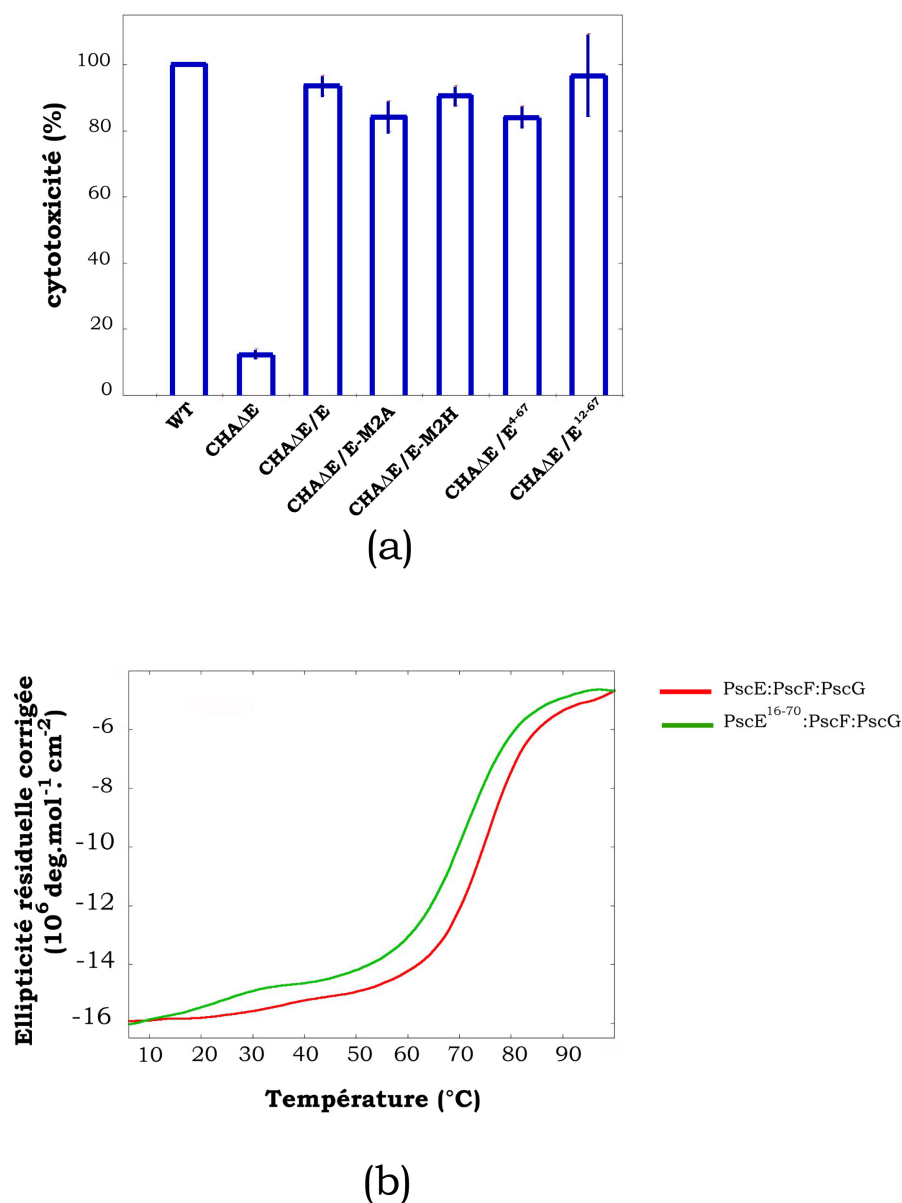


FIG. 16.9 – *L'hélice Ha ne joue au plus qu'un rôle mineur pour la cytotoxicité.*

(a) *Ni la méthionine 2 de PscE, ni l'hélice Ha ne sont importantes pour la cytotoxicité.*

(b) *Le complexe muté PscE¹²⁻⁶⁷:PscF:PscG a une température de fusion de 70°C, très similaire à la forme sauvage du complexe qui est dénaturée à 75°C. L'hélice Ha n'a donc tout au plus qu'un rôle mineur pour la stabilisation du complexe ternaire.*

Cinquième partie

Conclusions et Perspectives

Chapitre 17

Conclusions de ce travail de thèse

Certaines bactéries à Gram-négatif parmi les plus virulentes envers l'homme ont développé un système de pathogénicité très élaboré, le système de sécrétion de type III, qui leur permet d'injecter des protéines pour la virulence directement dans les cellules-cible infectées.

Chez *P. aeruginosa*, l'aiguille de sécrétion de type III, qui est une structure creuse de 500 Å de long et d'un diamètre interne de 20 Å, est formée d'un polymère de PscF, une petite protéine de 9 kDa [Pas2005]. La motivation de ce travail de thèse était d'apporter la première information structurale sur une protéine de l'aiguille d'un système de sécrétion de type III et d'élucider son mode d'assemblage afin de mieux pouvoir lutter contre des pathogènes utilisant ce système de virulence.

La première phase des travaux a consisté en l'étude de PscF surexprimée chez *E. coli*. Rapidement, cette protéine s'est révélée polymériser spontanément et il n'a pas été possible de dissocier les monomères. Dès lors, ceci compromettrait l'obtention d'une forme monomérique de PscF nécessaire à son étude structurale à haute résolution.

PscF possède une hélice α amphiphile à son extrémité C-terminale qui a été supposée être impliquée dans la polymérisation. Un mutant délété de cette hélice a alors été construit. Il s'est révélé être monomérique, ce qui a confirmé notre hypothèse de départ. Des cristaux de cette forme tronquée de PscF ont été obtenus, cependant ils n'ont pas conduit à une diffraction suffisante pour résoudre la structure cristallographique du monomère, probablement à cause de la faible stabilité

de la protéine tronquée.

Des partenaires cytoplasmiques de PscF ont alors été recherchés, ce qui a abouti à la caractérisation d'un complexe hétérotrimérique qui prend en charge PscF et le maintient sous forme monomérique avant sa sécrétion et sa polymérisation. Pour la première fois, il a ainsi été montré que deux protéines partenaires, PscE et PscG, concourent à bloquer la polymérisation prématurée de PscF dans le cytoplasme bactérien et à permettre sa sécrétion et la polymérisation d'une aiguille fonctionnelle. Ainsi, la formation de ce complexe hétérotrimérique est une condition nécessaire pour la cytotoxicité de *P. aeruginosa*.

PscE, PscF et PscG sont bien conservées dans la famille des injectisomes Ysc qui rassemble une large gamme de pathogènes de mammifères, d'insectes et même de plantes. Cette conservation suggère de fortes analogies de structure et des mécanismes dans lesquels ces 3 protéines sont impliquées, de sorte que les connaissances acquises à ce sujet chez l'un de ces organismes pourraient s'appliquer aux autres. Ceci confère une envergure plus large au projet de thèse.

Après de nombreux efforts de cristallisation et de mutagenèse, la structure d'une partie tronquée du complexe comprenant PscE et PscG entières et les 30 derniers résidus à l'extrémité C-terminale de PscF a été résolue. Remarquablement, l'hélice α C-terminale de PscF est maintenue parfaitement repliée contrairement à ce qui pouvait être attendu d'après la publication de STEBBINS [Ste2001] qui décrit la structure cristallographique d'un complexe effecteur/chaperonne du T3SS dans lequel l'effecteur SptP est maintenu déplié par un homotrimère de sa chaperonne SicP.

Il est à noter que cette hélice repliée mesure 25 Å de long. Préalablement à sa sécrétion, PscF peut donc être transportée partiellement dépliée à travers l'aiguille de sécrétion dont le diamètre interne mesure 20 Å dans le cas où la polymérisation se déroulerait à l'extrémité distale de l'aiguille, comme c'est le cas pour le flagelle.

Les résidus qui précèdent l'hélice α (résidus 55-67) sont eux maintenus étendus à la surface de PscG bien qu'ils soient prédit repliés en hélice α et qu'ils soient effectivement observés repliés dans d'autres structures qui ont été résolues simultanément à cette thèse (BsaL chez *Burkholderia pseudomallei* [Zha2006], MxiH chez *S. flexneri* [Dea2006] ou encore PrgI chez *S. typhimurium* [Wan2007]). Ceci suggère 2 hypothèses d'explication. Tout d'abord il est possible que ces résidus interagissent avec la partie N-terminale de PscF (qui a été tronquée afin de résoudre

la structure) et qu'en leur absence les résidus 55-67 ne puissent pas se replier correctement. Selon la seconde hypothèse, les résidus 55-67 pourraient eux aussi être impliqués dans la polymérisation de la fibre en interagissant avec l'hélice C-terminale de PscF. La prise en charge de PscF par ses partenaires permettrait alors de maintenir ces résidus dépliés afin d'empêcher leur interaction avec l'hélice C-terminale et ainsi d'empêcher la polymérisation prématurée de PscF. En outre, le maintien de ces résidus sous une forme dépliée pourrait être nécessaire pour que PscF puisse passer à travers l'aiguille.

La structure cristallographique révèle la stratégie de prise en charge de l'hélice α amphiphile de PscF nécessaire à sa polymérisation par la face concave hydrophobe du domaine TPR non prédit de PscG. Ainsi PscG joue un rôle de chaperonne de PscF en empêchant son agrégation ou sa polymérisation prématurée avant sa sécrétion. Cette interface hydrophobe est de plus nécessaire à la fonctionnalité du T3SS puisque suite à des mutations au niveau de cette interface visant à altérer le caractère hydrophobe de celle-ci le complexe ternaire ne peut plus se former. Rendre cette interface non fonctionnelle par la fixation d'une petite molécule qui viendrait prendre la place de l'hélice α C-terminale de PscF, et ainsi empêcher la fixation de cette dernière, bloquerait la formation du complexe ternaire et ainsi inhiberait le T3SS. En cela, cette interface entre PscG et PscF représente une nouvelle cible thérapeutique à exploiter.

PscE, en revanche, n'interagit avec PscF⁵⁵⁻⁸⁵ que par l'intermédiaire d'une unique méthionine ; la méthionine 2 de PscE située à l'extrémité N-terminale de l'hélice α Ha qui pointe vers une cavité de PscF. Cependant, malgré sa position remarquable dans la structure cristallographique, aucune fonction particulière de cette méthionine, ni même de l'hélice Ha, n'a pu être mise en évidence en terme de stabilité du complexe ternaire ou de cytotoxicité et la fonction de PscE vis-à-vis de PscF reste à élucider. PscE interagit avec PscG par des contacts hydrophobes impliquant la face convexe de PscG. Cette interaction vise à stabiliser PscG *in vitro* et *in vivo* et est nécessaire à la cytotoxicité de la bactérie. Une hypothèse est que PscE pourrait jouer un rôle lors de la dissociation du complexe ternaire, préalable à la sécrétion de PscF.

Chapitre 18

Perspectives de ces recherches

18.1 D'un point de vue fondamental : Fonction de PscE et mécanismes de dissociation du complexe ternaire

Deux questions fondamentales majeures encore non résolues ont été soulevées par ce travail de thèse :

- Quel est le rôle exact de PscE, et par conséquent, quelle est la justification de la présence de 2 protéines distinctes pour maintenir PscF sous forme monomérique?
- Quels mécanismes permettent la dissociation de ce complexe ternaire très stable, nécessaire pour la sécrétion et la polymérisation de PscF?

Les études proposées ci-dessous qui découlent des conclusions de cette thèse pourraient permettre d'apporter une réponse.

18.1.1 Recherche d'une interaction entre l'ATPase PscN et PscE:PscF:PscG ou avec les partenaires séparés

De telles études permettraient de déterminer quelle(s) protéine(s) parmi PscE, PscF et PscG interagiraient avec PscN, et plus finement, d'identifier la zone d'interaction.

Pour cela, il faudrait exprimer et purifier la forme entière de l'ATPase dont le

clone est disponible au laboratoire. Cette protéine est insoluble dans des conditions natives ; il est nécessaire de la purifier dans 6M Urée puis de procéder à sa renaturation. Des tests de renaturation dans 20% Glycérol ont, dès à présent, conduit à des résultats encourageants.

Des tests d'interaction avec PscE:PscF:PscG pourraient alors être réalisés en incubant les protéines ensembles et en procédant par chromatographie d'affinité pour le nickel (il faut pour cela cliver l'étiquette histidine de PscN ou celle de PscE:PscF:PscG au préalable), par électrophorèse en conditions natives ou par des techniques plus sophistiquées comme le Biacore disponible au LEM¹, ou la micro-calorimétrie au CERMAV² (Grenoble).

L'association à la membrane pourrait être requise pour la complexation de l'AT-Pase avec d'autres protéines du T3SS. Pour cette raison, il pourrait être nécessaire d'associer PscN à des membranes artificielles, les liposomes, avant de procéder à l'incubation avec PscE:PscF:PscG et aux tests d'interaction. Plusieurs méthodes de fabrication des liposomes et d'incubation existent, l'une d'elles est décrite dans la publication de SCHOEHN [Sch2003].

Dans tous les cas, il semble être nécessaire de travailler avec la protéine entière. En effet, des tests d'interaction ont également été conduits entre PscE:PscF:PscG et une forme tronquée de PscN, PscN⁹⁵⁻⁴⁴⁰, faiblement soluble dans 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl. Cependant, aucune interaction n'a pu être détectée par chromatographie d'affinité, ni par électrophorèse en conditions natives.

18.1.2 Recherche d'autres partenaires de PscE:PscF:PscG

Ces candidats peuvent être recherchés au sein du lysat soluble de la souche CHA de *P. aeruginosa*. Pour cela, la première étape consiste en la purification du complexe PscE:PscF:PscG, puis la fixation de la protéine purifiée sur résine Sépharose additionnée de nickel. Parallèlement, des cultures de la souche CHA dans les conditions inductrices pour le T3SS sont effectuées puis les cellules sont lysées dans différents détergents afin de solubiliser le maximum de protéines, particulièrement celles situées à la base de l'injectisome de sécrétion, comme l'ATPase, et étant donc des candidats potentiels. Une deuxième étape consiste en l'incuba-

¹LEM : Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, à l'IBS

²CERMAV : Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales

tion de la résine contenant le complexe ternaire avec le lysat soluble de CHA, sur la nuit à 4 ° C afin de favoriser une interaction. Après plusieurs lavages, les protéines qui sont restées fixées à la résine par l'intermédiaire de His₆-PscE sont éluées grâce à un palier de 400mM d'imidazole, et la fraction éluée est finalement analysée par électrophorèse et spectrométrie de masse dénaturante afin de détecter la fixation d'un éventuel partenaire présent dans le lysat soluble de la souche CHA sur le complexe ternaire. Il est aussi envisageable que le complexe ternaire soit dissocié par une protéine du lysat, comme ce qui doit se produire *in vivo*, ce qui conduirait à l'élution de His₆-PscE seul ou en complexe avec PscG.

Dans le cas de l'identification d'un partenaire, la purification de ce dernier avec le complexe ternaire pourrait être mise au point. Des études cristallographiques pourraient ensuite être initiées afin de résoudre la structure cristallographique du complexe entre cet autre partenaire et PscE:PscF:PscG afin de mieux comprendre leurs interactions.

18.2 D'un point de vue appliqué : Étude des interfaces protéine-protéine comme nouvelle cible pour l'antibiothérapie

La formation du complexe hétérotrimérique PscE:PscF:PscG est nécessaire à la cytotoxicité de *P. aeruginosa*. Grâce à la résolution de sa structure cristallographique, nous avons pu analyser les 2 interfaces protéine-protéine entre PscE et PscG et entre PscG et PscF. Celles-ci sont des zones cruciales pour la fonctionnalité du système de sécrétion de type III puisque leur altération pourrait bloquer la formation du complexe et par là inhiber la cytotoxicité bactérienne. La difficulté réside dans le fait que, dans les deux cas, les surfaces ciblées sont hydrophobes, et qu'une petite molécule hydrophobe pourrait avoir des difficultés à traverser la double membrane bactérienne, elle-même hydrophobe, afin d'accéder au cytoplasme bactérien où elle serait active. Cependant une telle approche a déjà été conduite avec succès [Guo2000] et l'enjeu thérapeutique de tels travaux justifie cette investigation.

Contrairement aux sites actifs des enzymes notamment, qui sont peu étendus et se présentent souvent sous la forme de profondes cavités, une surface d'interaction

protéine-protéine est souvent relativement plane. Pour cette raison elles ont longtemps été considérées comme difficiles à cibler par une petite molécule qui pourrait avoir des difficultés à s'y fixer. Cependant, les travaux conduits récemment dans ce domaine ont montré que tous les résidus impliqués dans l'interaction protéine-protéine ne jouent pas un rôle semblable dans l'interaction. Quelques résidus, les résidus critiques, jouent en effet un rôle prépondérant et il s'agit de les cibler afin d'altérer notablement la fonctionnalité de la surface d'interaction [Bog1998].

L'intérêt des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine réside dans la haute spécificité de ceux-ci, du fait de la haute complémentarité des surfaces protéiques en interaction. Ceci évite que les inhibiteurs viennent se fixer non spécifiquement sur d'autres cibles cellulaires. De plus, de tels inhibiteurs sont moins sensibles à des mutations qui pourraient modifier la surface d'interaction protéique et ainsi bloquer la fixation de l'inhibiteur. En effet, dans ce cas, des mutations devraient se produire simultanément des deux côtés de l'interface afin que les deux protéines puissent encore interagir, alors que la molécule inhibitrice ne se fixerait plus. Or, une telle double mutation est fortement improbable. De plus, un inhibiteur qui viendrait bloquer la formation du complexe PscE:PscF:PscG n'affecterait pas la survie de la bactérie, de sorte qu'il n'y aurait pas de pression évolutive qui favoriserait la sélection de telles mutations [Lau2007].

Ces avantages ont cependant longtemps été contrebalancés par la difficulté qui réside en l'étude de telles interfaces. Ce n'est plus le cas maintenant, où nous disposons d'outils de génomique structurale et de nombreux outils de criblage de petites molécules aussi bien *in vitro* (grâce à des banques de données de petites molécules très variées comme celle mise à la disposition des chercheurs par le NCI³) qu'*in silico* (logiciels Robetta et Chemaxon, programmes de Dynamique Moléculaire par exemple) qui sont de précieux atouts dans cette recherche ambitieuse et passionnante.

18.2.1 Interface PscE-PscG

La complexation de PscE et PscG est nécessaire à la cytotoxicité de la bactérie ; une petite molécule qui viendrait perturber cette complexation en se fixant sur l'interface aurait donc un rôle thérapeutique potentiel. Les premiers essais de mu-

³NCI : *National Cancer Institute*

tagenèse dirigée n'ont, dans ce cas, pas permis de caractériser de résidus critiques. Robetta, un logiciel qui crible les résidus d'une interface en les mutant successivement en alanine et en calculant la différence d'énergie libre induite au niveau de l'interface, n'a pas non plus permis l'identification de résidus cruciaux. Ces études sont donc à poursuivre en testant d'autres mutations *in vivo* et en recherchant d'autres logiciels. Ce travail est dès à présent poursuivi dans le laboratoire d'Ina ATTRÉE (iRTSV). Lorsque ces résidus seront identifiés il faudra identifier des petites molécules capable de se fixer spécifiquement et avec une haute affinité (de l'ordre du nM au moins) à leur surface éventuellement *in silico* puis *in vitro*, avant de vérifier que ces molécules sont également actives et spécifiques *in vivo* et sont capables de franchir la paroi bactérienne. Si ce n'est pas le cas, des collaborations avec des chimistes de synthèse devraient permettre des modifications des composés trouvés afin de leur faire respecter ces derniers critères.

18.2.2 Interface PscF-PscG

Nous avons montré, en effet, que des mutations visant à altérer le caractère hydrophobe de la face concave de PscG, qui constitue la surface d'interaction avec l'hélice α C-terminale de PscF, empêchent la formation d'un complexe ternaire stable. Nous avons en particulier détecté par stratégie de mutagenèse dirigée, basée sur l'observation de la structure cristallographique, 3 résidus de PscG cruciaux pour la fonctionnalité de cette interface : des "hot spots". Il s'agit de la leucine 43, le tryptophane 73 et la phénylalanine 105.

Ainsi, une petite molécule qui viendrait se loger dans la main hydrophobe de PscG à la place de l'hélice α C-terminale de PscF inhiberait la cytotoxicité de *P. aeruginosa*. Parmi les acides aminés cruciaux mis en évidence, le tryptophane 73 nous a semblé méthodologiquement particulièrement intéressant. En effet, excité à 280 nm, un tryptophane fluoresce à une longueur d'onde qui dépend du caractère hydrophobe de son environnement. La fixation d'une petite molécule à proximité du tryptophane 73 entraînerait un changement de son environnement, donc une modification de la longueur d'onde émise. Ceci pourrait être détecté par un fluoromètre.

Nous avons déjà fait synthétiser 2 peptides de 9 résidus chacun dont la séquence correspond à deux portions de 2 tours d'hélice de PscF autour du tryptophane 73

(figure 18.1) :

- Peptide 1 : Ser-Thr-Val-Thr-Arg-Ala-Leu-Arg-Asp
- Peptide 2 : Thr-Arg-Ala-Leu-Arg-Asp-Leu-Met-Gln

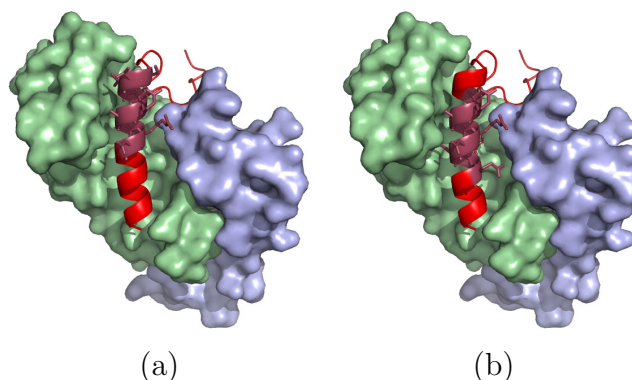


FIG. 18.1 – *En rose, portions de l'hélice α de PscF dont la séquence correspond à celle des peptides. (a) Peptide 1. (b) Peptide 2.*

Cependant, un spectre de dichroïsme circulaire a révélé que ceux-ci ne sont pas structurés, ce qui est mauvais signe pour qu'ils se fixent dans la cavité hydrophobe de PscG à la place de l'hélice α C-terminale de PscF.

Aucune interaction entre ceux-ci et le complexe PscE:PscG n'a en effet pu être mise en évidence par électrophorèse en conditions natives, ni par spectroscopie de fluorescence du tryptophane.

De façon intéressante, dans le laboratoire de chimie de synthèse de HAMILTON (Département de chimie, Yale University, New Haven), des chercheurs ont développé une famille de dérivés de terphenyls, petites molécules qui miment les positions i , $i+4$ et $i+7$ d'une hélice α qui, dans le cas d'une hélice α amphiphile, sont des résidus hydrophobes clé (figure 18.2-b) [Yin2004, Yin2005]. Au laboratoire de HAMILTON, de tels composés ont été étudiés dans le but de mimer l'hélice α amphiphile de Bak (figure 18.2-a). Bak est une protéine impliquée dans la formation de lymphomes et elle est pour cette raison étudiée dans le cadre d'un médicament anti-cancer.

Bak possède une hélice α amphiphile qui vient se loger dans une main hydrophobe de Bcl-xl. Les résidus hydrophobes de Bak qui interagissent avec Bcl-xl sont la valine 74, la leucine 78, l'isoleucine 81 et l'isoleucine 85. Ces résidus suggèrent

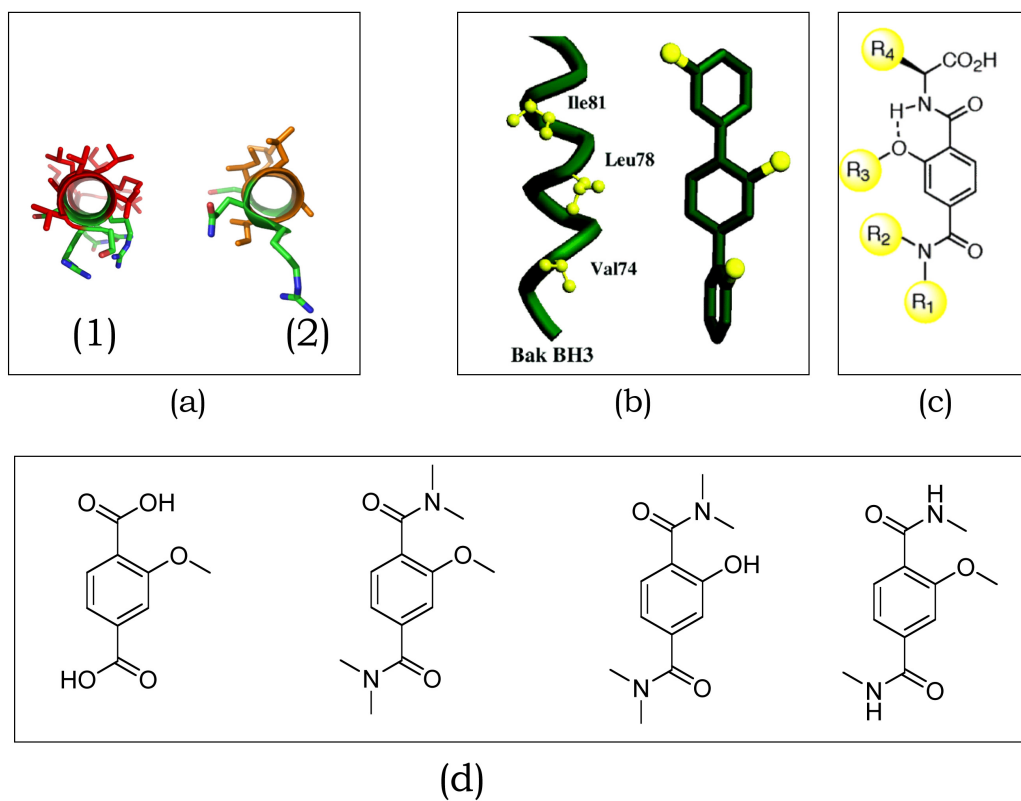


FIG. 18.2 – *Composés qui miment une hélice α amphiphile.* (a) L' hélice α C-terminale de PscF (1) et celle de Bak considérée ici (2) sont amphiphiles. (b) Les terphenyls miment les positions i , $i+4$ et $i+7$ d'une hélice α . (c) Un terphenylamide, composé développé par le laboratoire de HAMILTON (d'après YIN [Yin2004]). (d) 4 dérivés de terphenylamides ont dès à présent été synthétisés au Département de Chimie Moléculaire de Grenoble

une forte similarité entre l'hélice de Bak et l'hélice de PscF que l'on cherche à mimer puisque cet enchaînement de résidus est très proche des résidus hydrophobes de l'hélice C-terminale de PscF (la seule différence réside dans la valine 74 de Bak qui correspond à une leucine dans PscF). Ceci nous encourage à tester les dérivés mis au point dans le laboratoire d'HAMILTON dans le cas de l'étude de l'inhibition de l'interaction entre PscF et PscG.

L'intérêt de ces composés réside dans le fait que d'une part ils sont contraints, ce qui garantit leur structure et assure que les groupements chimiques seront correctement positionnés sur la surface protéique ciblée. D'autre part, les chimistes ont amélioré ces dérivés de terphenyls de façon à accroître leur solubilité. Ceci a conduit au développement des composés de la famille des terephthalamides (figure 18.2-c), solubles dans un solvant aqueux et dont la synthèse est facilitée. Enfin, dans le cadre de l'inhibition de l'interaction entre Bcl et Bak, les terephthalamides sont capables de rentrer dans des cellules humaines (HEK 293) et de se lier à Bcl préférentiellement à Bak, et ceci avec une forte affinité de l'ordre de 100nM [Yin2005].

Une collaboration a été initiée avec des chimistes du Département de Chimie Moléculaire (DCM) dirigé par Pascal Dumy à Grenoble, dans l'équipe de Chimie Inorganique REdox (CIRe). Dans ce cadre, 4 dérivés de terephthalamides ont dès à présent pu être synthétisés (figure 18.2-d).

Afin d'étudier la fixation de ces molécules dans la main hydrophobe de PscG, 3 stratégies sont envisageables. La première, déjà décrite, consiste à étudier la fluorescence du tryptophane 73 situé sur le site de fixation de PscF. Pour cela, des manipulations de biologie moléculaire sont en cours pour construire un clone contenant PscE et PscG (car le complexe PscE:PscG est plus stable que PscG seule). De plus, des mutations ont été réalisées au sein de PscG afin de muter 2 autres tryptophanes qui n'appartiennent pas à la cavité, et la fixation d'un inhibiteur ne modifierait donc pas leur longueur d'onde d'émission par fluorescence. En effet le signal résultant de ces deux tryptophanes génèrerait un bruit qui risquerait de masquer le signal recherché émis par le tryptophane 73 de PscG.

Une deuxième stratégie consiste à cristalliser le complexe binaire PscE:PscG (les conditions de cristallisation ne sont pas connues) et à effectuer des trempages ou de la co-cristallisation avec différentes molécules afin d'observer leur fixation éventuelle sur PscE:PscG par cristallographie des rayons X. Une autre possibilité

est d'étudier par RMN le complexe PscE:PscG marqué en ^{15}N et de chercher des différences de déplacement chimique des pics suite à l'ajout de terephthalamides. Ces deux dernières approches sont certes plus lourdes mais plus élégantes que la première, puisqu'elles permettent d'avoir une information très précise sur la zone de fixation de l'inhibiteur et les interactions impliquées. Ce travail sera poursuivi par d'autres membres du laboratoire.

Suite à cela, des tests cellulaires seront nécessaires afin de vérifier que les molécules retenues soient capables de traverser la double membrane de *P. aeruginosa* afin de rentrer dans la bactérie et de se lier à PscG, préférentiellement à l'hélice C-terminale de PscF. Il s'agira ensuite de vérifier que ces molécules ne soient pas toxiques pour l'organisme infecté, et si ce n'est pas le cas de les modifier en conséquence.

Sixième partie

Annexes

Annexe A

Abréviations

Å	Angström
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	enzyme qui hydrolyse l'ATP en ADP
CHA	3 premières lettres du nom du malade chez qui la souche de <i>P. aeruginosa</i> a été isolée
CHAPS	3-[(3-Clolamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
DLS	Diffusion de lumière dynamique
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	désoxyNucléotide Tri Phosphate
DO	Densité optique
DTT	1,4-dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	Ethylène glycol-bis(β -aminoethyl éther)-N,N,N',N'-tétraacetic acide
EGS	ethylene glycol bis(sulfosuccinimidyl succinate)
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
kDa	kilo Dalton ($1\text{Da} \Leftrightarrow 1\text{u.m.a} = \frac{1}{12} {}^{12}\text{C}$)
M	Molaire (1M=1 mole/L)

MAD	" <i>Multiwavelength Anomalous Dispersion</i> "
PEG	Poly Ethylène Glycol
PCR	" <i>Polymerase Chain Reaction</i> "
PDB	" <i>Protein Data Bank</i> "
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i> (organisme qui synthétise cette polymérase)
Pi	Phosphate inorganique
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
Pop	" <i>Pseudomonas outer proteins</i> "
Ppm	Partie par million
Psc	" <i>Pseudomonas secreted proteins</i> "
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rmsd	" <i>Root Mean Square Deviation</i> "
Rpm	Rotation par minute
SAD	" <i>Single Anomalous Dispersion</i> "
SDS-PAGE	gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes
Tm	"Melting temperature" (Température de fusion)
TPR	" <i>Tetratrico Peptide Repeat</i> "
Tris	Tris-(hydrométhyl)aminométhane
U.A.	Unité d'Absorbance
UV	Ultra violet (200 nm- 400 nm)

Annexe B

Table des constructions réalisées

Plasmide	Mutant	
pET-22b	PscF ¹⁻⁶⁷	•Résidus 1-67 de PscF.
pET-22b	PscF V70K/L77K	•Double mutant de PscF où la valine 70 et la leucine 77 sont mutées en lysines.
pET-22b	PscF L77K/I81K	•Double mutant de PscF où la leucine 74 et l'isoleucine 81 sont mutées en lysines.
pET-22b	PscF M78K/L82K	•Double mutant de PscF où la méthionine 78 et la leucine 82 sont mutées en lysines.
pIApG	PscF D76A	•Mutant de PscF où l'aspartate 76 est muté en alanine.
pIApG	PscF R72A/Q83A	•Mutant de PscF où l'arginine 72 et la glutamine 83 sont mutées en alanine.
pET-15b	PscE:PscF ⁵⁵⁻⁸⁵ :PscG	•Complexe ternaire comprenant PscE, PscG et les résidus 55 à 85 de PscF.
pET-15b	PscE:PscF:PscG L43S	•Complexe ternaire où la leucine 43 de PscG est mutée en sérine.

Plasmide	Mutant	
pET-15b	PscE:PscF:PscG W73S	•Complexe ternaire où le tryptophane 73 de PscG est muté en sérine.
pET-15b	PscE:PscF:PscG F105S	•Complexe ternaire où la phénylalanine 105 de PscG est mutée en sérine.
pET-15b	PscE:PscF:PscG W73S/F105S	•Complexe ternaire où le tryptophane 73 et la phénylalanine 105 de PscG sont mutés en sérine.
pIApG	PscE:PscF:PscG L14S	•Complexe ternaire où la leucine 14 de PscG est mutée en sérine.
pIApG	PscE:PscF:PscG L43S	•Complexe ternaire où la leucine 43 de PscG est muté en sérine.
pIApG	PscE:PscF:PscG W73S	•Complexe ternaire où le tryptophane 73 de PscG est muté en sérine.
pIApG	PscE:PscF:PscG F105S	•Complexe ternaire où la phénylalanine 105 de PscG est muté en sérine.
pIApG	PscE:PscF:PscG L14S/L43S	•Complexe ternaire où les leucines 14 et 43 de PscG sont mutées en sérine.
pIApG	PscE:PscF:PscG L43S/W73S	•Complexe ternaire où la leucine 43 et le tryptophane 73 de PscG sont mutés en sérine.
pIApG	PscE:PscF:PscG W73S/F105S	•Complexe ternaire où le tryptophane 73 et la phénylalanine 105 de PscG sont mutés en sérine.
pET-15b	PscE ¹²⁻⁶⁷ :PscF:PscG	•Complexe ternaire comprenant PscF, PscG et les résidus 12 à 67 de PscE.
pIApG	PscE M2A:PscF:PscG	•Complexe ternaire où la méthionine 2 de PscE est mutée en alanine.
pIApG	PscE M2H:PscF:PscG	•Complexe ternaire où la méthionine 2 de PscE est mutée en histidine.
pIApG	PscE ⁴⁻⁶⁷ :PscF:PscG	•Complexe ternaire comprenant PscF, PscG et les résidus 4 à 67 de PscE.
pIApG	PscE ¹²⁻⁶⁷ :PscF:PscG	•Complexe ternaire comprenant PscF, PscG et les résidus 12 à 67 de PscE.

Annexe C

Amorces utilisées pour la mutagenèse

Mutations dans l'hélice α N-terminale de PscE.

pIApG-*PscE* M2A:*PscF*:*PscG*.

GGA GAT ATA CAT ATG GCG ACA GCC TTG GAA ACG C

GCG TTT CCA AGG CTG TCG CCA TAT GTA TAT CTC C

pIApG-*PscE* M2H:*PscF*:*PscG*.

GGA GAT ATA CAT ATG CAC ACA GCC TTG GAA ACG C

GCG TTT CCA AGG CTG TGT GCA TAT GTA TAT CTC C

pIApG-*PscE*⁴⁻⁶⁷:*PscF*:*PscG*.

G CCG CGC GGC AGC CAT ACA GCC TTG GAA ACG C

GCG TTT CCA AGG CTG TAT GGC TGC CGC GCG GC

pIApG-*PscE*⁴⁻⁶⁷:*PscF*:*PscG*.

GAA GGA GAT ATA CAT ATG TTG GAA ACG CGA CTG TCG G

CCG ACA GTC GCG TTT CCA ACA TAT GTA TAT CTC CTT C

pET15b-*PscE*¹²⁻⁶⁷:*PscF*:*PscG*. Egalement utilisé dans plapG (*in vivo*).

GGT GCC AAG CTT TAA TGC GGT AGT TTA TCA CAG

AAAAA CAT ATG GAC GGC ACG CAT GCC GCA GCG

Mutations des W267 et W279 de PscG dans pETDuet-*PscE-PscG* pour les études de fixation d'un inhibiteur.

pETDuet-*PscE-PscG*W267N.

CCATGGCAATCCCAATCCGGCGCTGGAGC

GCT CCA GCG CCG GAT TGG GAT TGC CAT GG

pETDuet-*PscE-PscG*W279N.

CTTGTGCGAGTTGCACCTGGGG

CCC CAG GTG CAA CTC GCA CAA G

Délétion des résidus 68-85 de PscF.

pET15b-*PscF*¹⁻⁶⁷.

C ATC TAC AAC ATC AAC TGA ACG GTG ACC CGT GCG C

G CGC ACG GGT CAC CGT TCA GTT GAT GTT GTA GAT G

Mutation des résidus hydrophobes de l'hélice C-terminale de PscF.

pET22b-*PscF*V70K.

CATCAACTCGACGAAAACCCGTGCGCTGC

GCAGCGCACGGGTTTTTCGTGCGAGTTGATG

pET22b-*PscF*L77K.

GCGCTGCGCGACAAAATGCAAGGCATCC

GGATGCCTTGCAATTTTGTGCGCGAGCGC

pET22b-*PscF*M78K.

GCTGCGCGACCTGAAACAAGGCATCCTGC

GCAGGATGCCTTGTTTCAGGTGCGCGAGC

pET22b-*PscF*L82K.

CTGAAACAAGGCATCAAACAGAAGATCCTCGAGCAC

GTGCTCGAGGATCTTCTGTTTGATGCCTTGTTTCAG

pET22b-*PscF*L74K.

CGGTGACCCGTGCGAAACGCGACCTGATGC

GCATCAGGTGCGGTTTCGCACGGGTCACCG

pET22b-*PscF*I81K.

GACCTGATGCAAGGCAAACTGCAGAAGATCCTCG

CGAGGATCTTCTGCAGTTTGCCTTGCATCAGGTC

Mutation des résidus hydrophobes de PscG qui interagissent avec l'hélice C-terminale de PscF.

pIApG-*PscE-PscF-PscGL14S*.

GGAAGTGGCGAGCGCCGGCAGCG

CGCTGCCGGCGCTCGCCAGTTCC

pIApG-*PscE-PscF-PscGL43S*. Egaleme nt utilisé dans pET-15b.

AAGCGGCGCGGAGCATCCGGATTTC

GAAATCCGGATGCTCCGCGCCGCTT

pIApG-*PscE-PscF-PscGW73S*. Egaleme nt utilisé dans pET-15b.

GCGCTGGAGCCCAGCTTCGCCTTGTGC

GCACAAGGCGAAGCTGGGCTCCAGCGC

pIApG-*PscE-PscF-PscGF105S*. Egaleme nt utilisé dans pET-15b.

GCCCTGGCCGACAGCGCCGCGGCATG

CATGCCGGCGGCGCTGTGCGCCAGGGC

Annexe D

Publications

Publication 1

Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A. et Attree, I.

The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*

J. Biol. Chem. (2005) **280**, 36293-36300.

The PscE-PscF-PscG Complex Controls Type III Secretion Needle Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*^{*[5]}

Received for publication, July 25, 2005, and in revised form, August 18, 2005 Published, JBC Papers in Press, August 22, 2005, DOI 10.1074/jbc.M508089200

Manuelle Quinaud^{†1}, Jacqueline Chabert[§], Eric Faudry[§], Emmanuelle Neumann[‡], David Lemaire[‡],
Alexandrine Pastor[§], Sylvie Elsen[§], Andréa Dessen[‡], and Ina Attree^{§2}

From the [§]Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, UMR 5092 CNRS/Commissariat à l'Energie Atomique (CEA)/Université Joseph Fourier (UJF), Département de Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09 and the [‡]Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS/CEA/UJF, Grenoble, France

Type III secretion (T3S) systems play key roles in pathogenicity of many Gram-negative bacteria and are employed to inject toxins directly into the cytoplasm of target cells. They are composed of over 20 different proteins that associate into a basal structure that traverses both inner and outer bacterial membranes and a hollow, needle-like structure through which toxins travel. The PscF protein is the main component of the *Pseudomonas aeruginosa* T3S needle. Here we demonstrate that PscF, when purified on its own, is able to form needle-like fibers of 8 nm in width and >1 μ m in length. In addition, we demonstrate for the first time that the T3S needle subunit requires two cytoplasmic partners, PscE and PscG, in *P. aeruginosa*, which trap PscF in a ternary, 1:1:1 complex, thus blocking it in a monomeric state. Knock-out mutants deficient in PscE and PscG are non-cytotoxic, lack PscF, and are unable to export PscF encoded extrachromosomally. Temperature-scanning circular dichroism measurements show that the PscE-PscF-PscG complex is thermally stable and displays a cooperative unfolding/refolding pattern. Thus, PscE and PscG prevent PscF from polymerizing prematurely in the *P. aeruginosa* cytoplasm and keep it in a secretion prone conformation, strategies which may be shared by other pathogens that employ the T3S system for infection.

Type III secretion (T3S)³ systems are present in most Gram-negative bacteria and are devoted to the secretion and injection of bacterial toxins (effectors) directly into the target cell cytoplasm. Such nanomachines, which play key roles in functions such as virulence and symbiosis, are composed of ~20 distinct proteins, and translocated effectors possess diverse enzymatic activities and target major cellular processes ranging from actin assembly to apoptosis (1–3). Macromolecular components of T3S injectisomes from a variety of pathogens display high levels of sequence similarity and are assembled in supramolecular structure, reminiscent of the bacterial flagellar apparatus, and imbedded within the two bacterial membranes (4, 5). The basal portion of the injectisome consists of two sets of protein rings to which is associated a needle-like structure, which may protrude up to 80 nm from the bacterial surface (6–13). The needle is essential for secretion and translocation and is the hollow conduit through which effectors travel to reach

the target cell (9, 14, 15). At the level of the host cell membrane, the translocation process is initiated by the insertion of a proteinaceous pore whose components are themselves transported through the needle-like conduit, which gives access to the target cell cytosol to other T3S-translocated effectors (16–20). Effectors and translocators are thought to travel in partially unfolded states through the needle, which, in all bacteria studied to date, is mostly composed of one polymerized small molecular mass protein (PrgI in *Salmonella* sp., MxiH in *Shigella* sp., and YscF in *Yersinia* sp.) (7, 8, 12, 21, 22). Although the precise steps involved in needle assembly are still unclear, many details can be inferred from studies performed on the *Salmonella* SPI-1-encoded and enteropathogenic *Escherichia coli* T3S systems, which suggest that only upon full assembly of the basal structure can needle components be secreted and subsequently polymerize onto the surface of the cell (23, 24). In *Yersinia* sp., the length of the needle is strictly controlled by YscP, a 50-kDa protein that acts as a molecular ruler (25, 26).

In T3S virulence and flagellar systems, secretion-prone effectors are stabilized within the bacterial cytoplasm by small, acidic chaperones, that remain within the cytosol after effector secretion (27–30). Interestingly, even though cognate molecules must be released from the chaperone prior to secretion, association constants between these complexes are in the nanomolar range (27, 31, 32). The mechanism of dissociation of these tight complexes is still unknown, but it is conceivable that the ATPase located on the cytosolic side of the base structure, which is believed to couple ATP hydrolysis and effector translocation through the T3S conduit, may also play the role of “docking platform” (22, 33, 34). To date, chaperones have been reported as being dedicated molecules, binding to one or, at most, two effectors or translocators (35). Chaperones that bind to building blocks of filament or flagellum-forming proteins play the key role of preventing early polymerization of their cognate molecules (32, 36). This is the case for FliC units, which polymerize at the distal end of a growing flagellum; within the bacterial cytoplasm, FliC is chaperoned by FliS, which traps it in a monomeric state (36). Likewise, CesA, a small acidic chaperone, prevents oligomerization of EspA, a protein that forms a filamentous structure prolonging the T3S needle, observed uniquely in enteropathogenic *E. coli* strains (32). However, the identity of chaperones recognizing the T3S needle-forming subunits, as well as the mechanism behind T3S needle formation, have remained elusive.

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen responsible for severe nosocomial infections as well as untreatable chronic disease in cystic fibrosis patients (37, 38). The cytotoxicity of clinical isolates is strictly dependent on a functional type III injectisome that is able to translocate four distinct effectors/exoenzymes (ExoS, ExoT, ExoU, and ExoY), all of which play key roles in eukaryotic cell intoxication (39–41). Genes required for assembly, regulation, and function of the T3S system in *P. aeruginosa* are located on the bacterial

* This work was supported in part by the French cystic fibrosis association “Vaincre la Mucoviscidose.” The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table 1S.

¹ Recipient of a CFR fellowship from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA).

² To whom correspondence should be addressed: Tel.: 33-438-783-483; Fax: 33-438-784-499; E-mail: iattreedelic@cea.fr.

³ The abbreviations used are: T3S, Type III secretion; CHA, *P. aeruginosa* wild-type strain; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

chromosome and clustered in five operons, one of which, *exsDpscBC-DEFGHIJKL* (Fig. 1A), encodes needle assembly components, among others. Notably, purified *P. aeruginosa* T3S needles are composed mostly of PscF, and a deletion mutant of this gene loses the ability to secrete effector proteins into culture supernatants or translocate molecules into the host cell cytoplasm. It is of interest that antibodies directed against YscF from *Yersinia pestis* have recently been shown to protect against bubonic plague in a mouse model, suggesting that needle-forming subunit proteins could also represent therapeutic targets (43).

In this work, we identify and characterize, for the first time, the macromolecules that participate in T3S needle biogenesis. We show that PscF from *P. aeruginosa* is able to form robust needle-like structures of different lengths when expressed on its own. Within the bacterial cytoplasm, PscF forms a stable, soluble complex with PscE and PscG in 1:1:1 stoichiometry, thus being trapped in a monomeric state. PscG and PscE are absolutely required for type III secretion and cytotoxicity of *P. aeruginosa* by influencing intrabacterial PscF levels. Moreover, overproduced PscF cannot be exported and assembled into the needle in PscE- and PscG-deficient mutant strains, suggesting that the formation of the PscE-PscF-PscG complex is required for proper targeting of PscF to the secretion. Circular dichroism melting temperature studies show that, as the number of macromolecules in the complex increases, so does thermodynamic stability, with the ternary PscE-PscF-PscG complex being more stable than its respective components. Thus, in the T3S needle biogenesis mechanism, two distinct macromolecules fulfill roles of preventing premature polymerization of the needle-forming subunit within the cytoplasm and maintaining it in a secretion-prone conformation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains and Growth Conditions—Cytotoxic *P. aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA (44) was used as the parental strain, and all mutants are isogenic to it. *P. aeruginosa* strains were grown on *Pseudomonas* Isolation Agar (Difco) plates or in liquid Luria broth (LB) at 37 °C with agitation. Carbenicillin was used at 500 µg/ml for *Pseudomonas* Isolation Agar plates and 300 µg/ml in LB. For type III induction, *P. aeruginosa* overnight cultures were diluted to an optical density at 600 nm (A_{600}) of 0.2 in LB containing 5 mM EGTA and 20 mM MgCl₂. Incubation was prolonged for additional 3 h until the cultures reached A_{600} values of 1.2–1.5. *E. coli* DH5α cells were used for standard cloning experiments, whereas *E. coli* BL21(DE3)Star (Invitrogen) was used for overproduction of all His-tagged recombinant proteins.

Construction of Expression Vectors—The *pscEFGHI* part of the *exsD-pscBCDEFGHIJKL* operon was amplified by standard PCR procedures from CHA genomic DNA and cloned into a TOPO vector (Invitrogen). During this work, we found that PscE contained two amino acid mutations when compared with the *P. aeruginosa* PAO1 sequence: C40G and H43R (45).⁴ These changes were confirmed in several independent PCR reactions. Genes of interest were amplified by PCR with TOPO/EFGHI as a template and subsequently cloned into either pET-15b (Novagen) downstream from a hexahistidine tag, for *pscE*, *pscG*, and *pscEFGHI*, or pET-22b (Novagen) for *pscF* leading to the *pscF-his6* fusion (see Table IS in supplemental material).

Expression and Purification of PscE, PscF, PscG, and PscE-PscF-PscG—Protein expression in *E. coli* BL21(DE3)Star was similar in all cases and was induced in Terrific broth (TB, Difco) with 1 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside at 37 °C for 3 h. Cells were harvested by centrifugation

and lysed by sonication in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 M NaCl, 2% glycerol. Supernatants were cleared by centrifugation and applied to a Ni²⁺-Sephacrose column, pre-equilibrated in 25 mM Tris-HCl, pH 7.15, 0.2 M NaCl, 20 mM imidazole, 2% glycerol (except for PscE, in which 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, was employed). Proteins were eluted with a step imidazole gradient and were subsequently eluted from a gel filtration column (Amersham Biosciences HR10/60) in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA. 10 mM dithiothreitol was added to the samples after gel filtration. PscG was subsequently submitted to further purification on a Mono Q column in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA and 5 mM dithiothreitol, being eluted with a NaCl gradient to 0.5 M.

Construction of Knock-out Mutants—The CHAΔF strain is described elsewhere (42). PscE and PscG knock-out strains (CHAΔE and CHAΔG) were created by exchanging the wild-type copy of the gene by a deleted copy harbored on a non-replicative plasmid. The list of primers and constructed plasmids is provided in supplemental Table IS. The exchange was generated by a double recombination event obtained by negative selection procedure using the *sacB* gene (46, 59). Selection for double recombination events was achieved by growing co-integrate strains on plates containing 5% sucrose. Carbenicillin-sensitive, sucrose-resistant strains were checked for correct replacement of the wild-type allele by the *pscE*- and *pscG*-deleted alleles by PCR and further verified by Southern blotting. All mutants were complemented in *trans* by a wild-type gene and checked for the restoration of the phenotype to ensure non-polarity of the mutation. All complementations were performed using pIAPG in which the *gfp* cassette was replaced by the gene of interest, thus placing it under the control of the type III promoter *ppcrG* (pG), as described previously (47). The construction of pIAPG/*pscF*, which is able to complement the *pscF* deletion, is described elsewhere (42). The *pscE* and *pscG* genes were recovered from pET-15b/*pscE* and pET-15b/*pscG* using NdeI-HindIII digestion and cloned into NdeI-HindIII-digested pIAPG. In this case, the ribosome binding site from the *gfp* cassette that was left in the plasmid is used for the *pscE* and *pscG* translation. The *his6-pscE* and *his6-pscG* fusions were transferred to *P. aeruginosa* by introducing XbaI-HindIII fragments from pET-15b/*pscE* and pET-15b/*pscG* into pIAPG. Type III secretion capacity of all strains was checked systematically *in vitro*, by triggering the secretion in LB supplemented with 5 mM EGTA and 20 mM MgCl₂ and analyzing culture supernatants on SDS-PAGE (48).

Immunoblotting Analysis—Cell extracts were obtained from *P. aeruginosa* cells, which were broken by sonication and ultracentrifuged. Proteins in cleared lysates were resolved on SDS-18% PAGE run in Tris-Tricine buffer and transferred to nitrocellulose membrane. For batch purifications, *P. aeruginosa*-cleared lysates were incubated with Ni²⁺ beads (His-select Nickel Affinity Gel, Sigma). Washing and elution steps were performed as recommended by the supplier. Anti-PscE and anti-PscG antibodies were raised in mouse at HybrIsère (Grenoble, France) using His₆-tagged recombinant proteins. Anti-PcrV antibodies and anti-PscF antibodies were raised in rabbits (47).⁴ Secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated (Sigma). Membranes were developed with the ECL kit (Amersham Biosciences).

Infection Experiments and Cytotoxicity Assays—All cytotoxicity assays were performed as described previously (49) by using macrophage cell line J774. Cell death was determined with the use of a cytotoxicity detection kit (LDH; Roche Applied Science).

Circular Dichroism Measurements—Circular dichroism spectra were measured on a Jasco J-810 spectropolarimeter at 22 °C in a 1-mm cell in 10 mM sodium phosphate, pH 7.2, 0.1 M NaCl at protein concentrations of 0.2 mg/ml for all samples. Subsequently, the thermodynamic stability was recorded at 222 nm by monitoring the circular dichroism signal in a range

⁴ Available at www.pseudomonas.com.

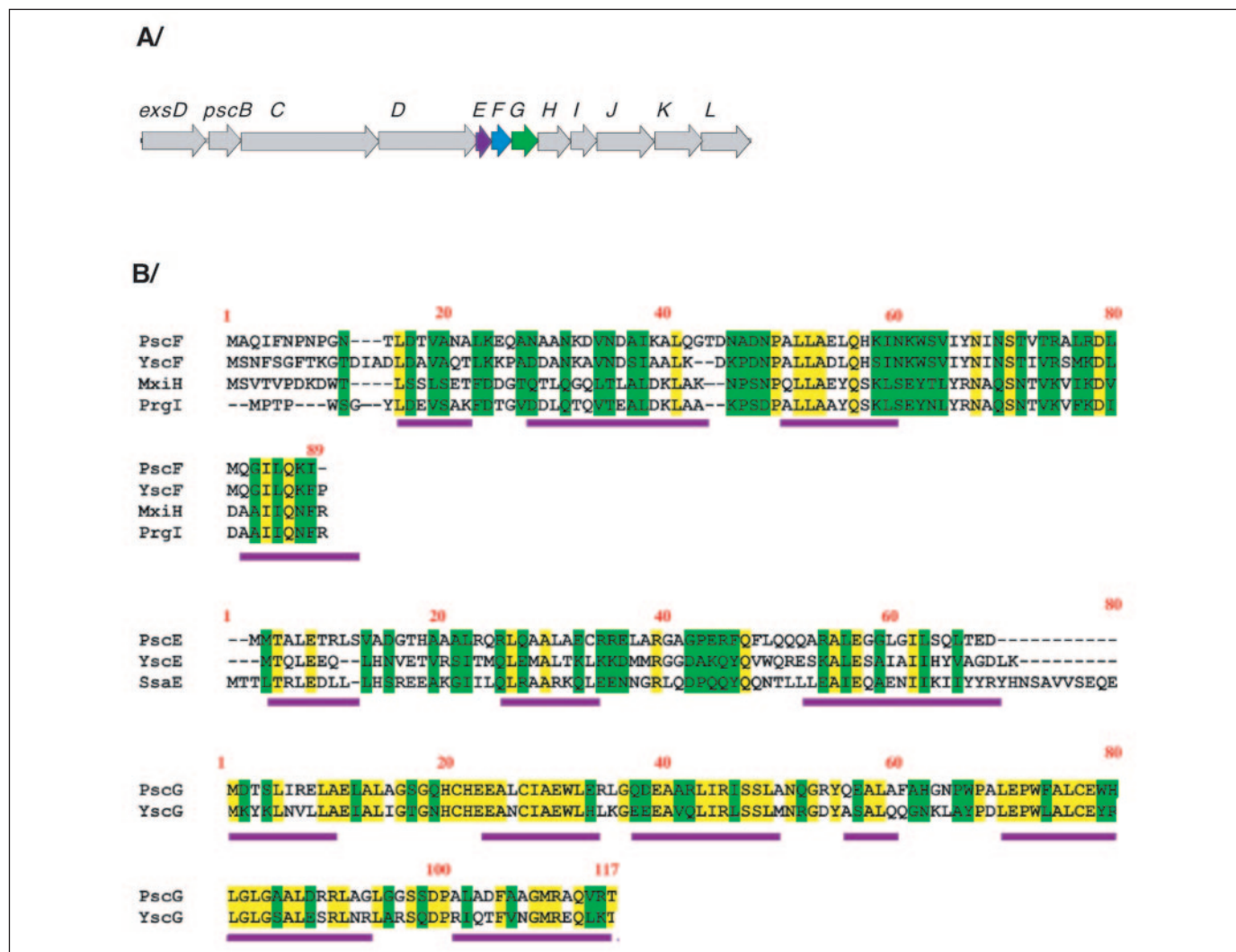


FIGURE 1. A, *exsD-pscBCDEFGHIJKL* operon of *P. aeruginosa*. *pscF* encodes the major unit of the type III needle. Genes deleted in this study are presented in colors. B, sequence alignments between PscF, YscF, MxiH, and PrgI from *P. aeruginosa*, *Y. pestis*, *Shigella flexneri*, and *Salmonella typhimurium*, respectively. PscF and YscF display 69% identity, whereas PscF and MxiH or PscF and PrgI display 25% identity. PscE displays 25% identity with YscE from *Y. pestis*, and 22% with SsaE from *S. typhimurium*. PscG and YscG (*Y. pestis*) share 47% sequence identity. Identical residues are shown in yellow highlights; homologous residues are in green. Predicted α -helical regions are indicated with purple bars.

of 4–96 °C with scan rate of 1 °C/min for increasing and decreasing temperature assays. The spectra were corrected against those of the buffer reference. The measured ellipticity was adjusted to the same starting value for all samples for a better visualization of the curves.

The equilibrium constant $K(T)$ was determined using the equation $K(T) = f_U/f_F = (y_F - y)/(y - y_U)$, where measured ellipticity values (y) were considered as linear combinations of the limit values of the folded state (y_F) and of the unfolded state (y_U) and $y = y_F f_F + y_U f_U$. The free energy curves were calculated using the equation, $\Delta G(T) = -RT \ln(K(T))$, where R is the gas constant ($R = 1.987$ calories/degree/mole) and T is the absolute temperature (in Kelvin). The melting temperature (T_m) was determined at $\Delta G(T_m) = 0$.

Mass Spectrometry—Samples at 1 μ M in water/acetonitrile (1/1, v/v) with 0.2% formic acid were infused at a flow rate of 5 μ L/min. Mass spectra were recorded in the 500- to 1800- m/z range in a Q-TOF Micro mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with an electrospray ion source operated with a needle voltage of 3 kV, with sample cone and extraction cone voltages of 45 and 2 V, respectively. Data were acquired in the positive mode, and calibration was performed using the multiply charged states produced by a separate injection of

heart horse myoglobin dissolved in water/acetonitrile (1/1, v/v) with 0.2% formic acid. For native experimentation, sample cone and extraction cone voltages were of 150 and 7 V, respectively. The backing Pirani pressure was set at 4.4 mbar. Mass spectra were recorded in the 2000–6100 mass-to-charge (m/z) range with sample concentrations at 20 μ M in 20 mM ammonium bicarbonate and continuously infused at a flow rate of 7 μ L/min. Data were acquired in the positive mode, and calibration was performed using a solution of 0.5 mg/ml CsI in water/isopropyl alcohol (1/1, v/v). Data were processed with MassLynx 4.0 (Micromass).

Electron Microscopy—Samples at a concentration of 0.15 mg/ml were applied to the clean side of carbon on mica (carbon/mica interface) and negatively stained with 1% phosphotungstic acid. A grid was placed on top of the carbon film, which was subsequently air dried. Micrographs were taken under low dose conditions with a Philips CM12 microscope operating at 120 kV and a nominal magnification of 45,000.

RESULTS

Two Distinct Molecules Prevent PscF Polymerization within the Bacterial Cytoplasm—PscF is the major T3S needle building block in *P. aeruginosa* (42), and displays 69% sequence identity to YscF, the

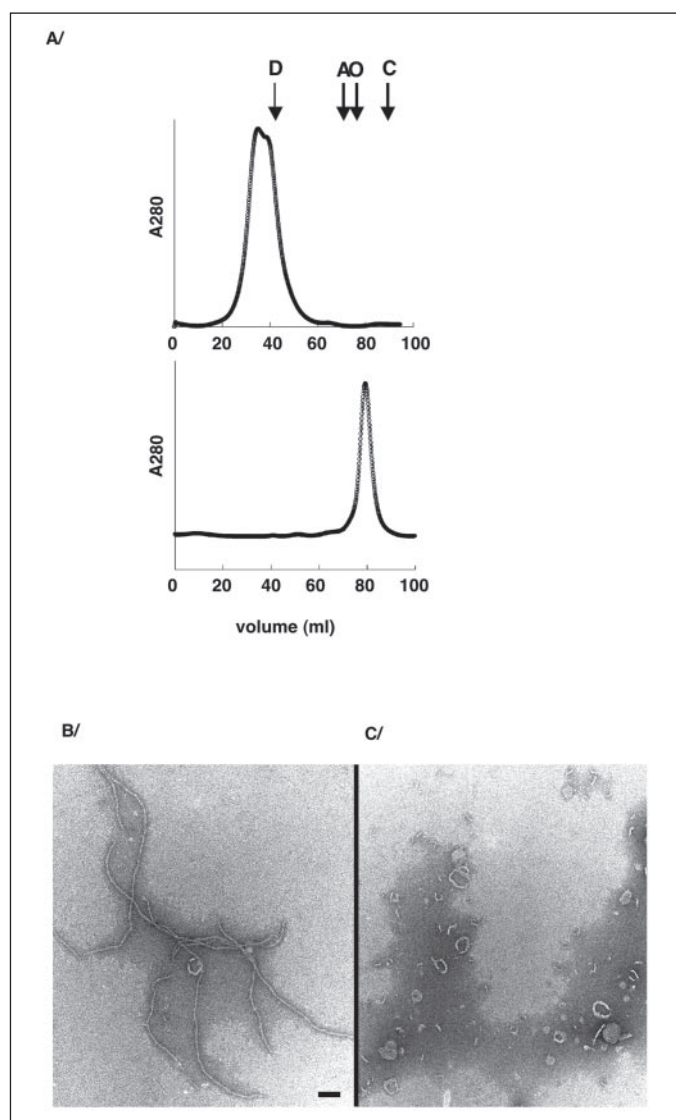


FIGURE 2. PscE and PscG block the polymerization of PscF. A, analytical gel filtration analyses of PscF (top) and PscE-PscF-PscG (bottom). PscF-His₆ and the His₆-PscE-PscF-PscG complex were first purified by Ni²⁺ affinity chromatography and then loaded on gel filtration column. The column was calibrated with dextran blue (D), albumin (A; 67 kDa), ovalbumin (O; 43 kDa), and chymotrypsinogen A (C; 25 kDa). Electron micrographs of negative stained PscF eluted at the forefront (B) and tail (C) of the void peak of a gel filtration column, revealing elongated, polymerized needle-like structures. Shorter fibers which elute at the end of the gel filtration peak may be intermediates of PscF fiber formation. Scale bar, 80 nm.

major T3S needle component of *Yersinia* sp. (12), while harboring only 25% identity to T3S needle monomers of *Salmonella* and *Shigella* sp. (PrgI and MxiH, respectively, Fig. 1B). PscF is a naturally self-associating protein, which, when expressed in *E. coli* and purified by chromatography, elutes as a complex peak in the void volume of an analytical gel filtration column (Fig. 2A). Negative-stained electron microscopy images of samples obtained from the forefront of the void volume peak reveal that PscF forms highly elongated needle-like fibers of >1 μ m in length (Fig. 2B), a value that is reminiscent of lengths of needles observed in *Shigella* strains, which overproduce MxiH (9) or lack a protein controlling needle length (50). The width of the PscF needle-like structures is ~8 nm, a value that is in agreement with that for T3S needles isolated directly from different pathogenic species (9, 11, 12) (Fig. 2B)). The latter part of the gel-filtration peak contains shorter

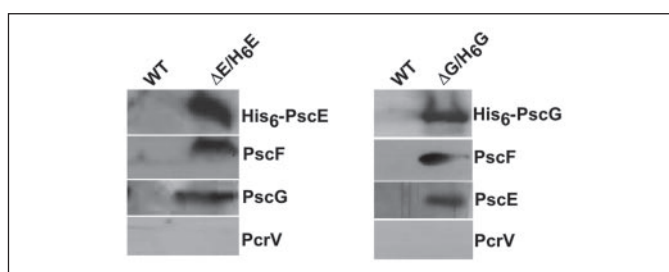


FIGURE 3. The PscE-PscF-PscG ternary complex exists in the *P. aeruginosa* cytoplasm. Batch Ni²⁺-affinity purifications were applied to cleared lysates from wild-type *P. aeruginosa* (WT) and mutant strains producing functional His₆-PscE (Δ E/H₆E) and His₆-PscG (Δ G/H₆G). After washing steps, eluted aliquots were analyzed by immunoblotting with anti-PscG, anti-PscE, and anti-PscF antibodies. PcrV, which does not associate to the needle complex, was used as a control.

needle-like structures (Fig. 2C), which may be representative of intermediary forms of the fully polymerized molecule.

The high propensity of PscF to generate elongated polymers suggests that, within the bacterial cytoplasm, its polymerization must be blocked by a macromolecular "bodyguard." To identify this molecule, we over-expressed and purified protein products from a polycistronic expression vector encoding the *pscEFGHI* section of the *exsD-pscBCDEFGHIJKL* *P. aeruginosa* operon (Fig. 1A) in an *E. coli* system, where the construct introduced a hexahistidine tag to the N terminus of PscE. This experiment yielded three co-purified polypeptides after Ni²⁺ affinity chromatography and gel filtration, which were identified as His₆-PscE (9,326 Da), PscF (9,153 Da), and PscG (12,451 Da) by mass spectrometry (data not shown). Elution of the ternary complex from a gel-filtration column revealed that it migrates much slower than PscF-His₆ on its own (Fig. 2A), and its stoichiometry was found to be 1:1:1 by native mass spectrometry, which yielded a molecular mass of 30,933 Da (expected molecular mass 30,930 Da). It is of note that neither PscE nor PscG could rescue polymerized PscF when the proteins were expressed and purified separately, and formation of the soluble 1:1:1 complex required that all three proteins be expressed concomitantly from the same operon (data not shown). This result indicates that PscE and PscG trap PscF in a monomeric state within a ternary complex and thus act as inhibitors of PscF polymerization.

To demonstrate the existence of the PscE-PscF-PscG complex in the *P. aeruginosa* cytoplasm, cell extracts from a cytotoxic, *P. aeruginosa* wild-type strain (CHA) or PscE and PscG-deficient strains expressing either His₆-PscE or His₆-PscG, respectively, were batch-incubated with Ni²⁺ affinity beads. Subsequently, the bound material was washed and eluted. Aliquots of eluted fractions were analyzed by immunoblotting using antibodies raised against recombinant PscF, PscE, and PscG. Eluted fractions obtained from *P. aeruginosa* cells synthesizing His₆-PscE contained PscF and PscG, and from those synthesizing His₆-PscG contained PscF and PscE (Fig. 3). Thus, in the *P. aeruginosa* cytoplasm, both PscE and PscG were able to associate to other members of the ternary complex.

PscE and PscG Are Required for Needle Biogenesis in *P. aeruginosa*—To examine the function of PscE and PscG in T3S and needle formation, we deleted the *pscE* and *pscG* genes from the chromosome of the cytotoxic *P. aeruginosa* strain CHA by a double recombination technique, generating strains CHA Δ E and CHA Δ G. The CHA Δ E strain was unable to secrete any of the type III proteins under *in vitro* inducing conditions (Ca²⁺ depletion) and was non-cytotoxic on a macrophage cell line. Both phenotypes were restored in the mutant strain complemented with PscE or His₆-PscE, showing that the mutation does not affect the expression of the downstream genes of the operon (Fig. 4A). Subse-

FIGURE 4. PscE is required for cytotoxicity and needle assembly. *A*, macrophage cell line J774 was infected at multiplicity of infection of 5 with bacteria grown to mid-exponential phase. Cell death was assayed at 3 h post-infection by measuring the release of lactate dehydrogenase into cell supernatants. *B*, cell extracts from different *P. aeruginosa* strains were analyzed by Western blotting using antibodies raised against recombinant PscE, PscF, and PcrV, an unrelated T3S protein used as loading marker. PscF-deficient mutant strain (ΔF) as well as complemented strain ($\Delta F/F$) were used as controls. The blot was revealed by chemiluminescence. Note the absence of PscF in the PscE-deficient mutant (ΔE).

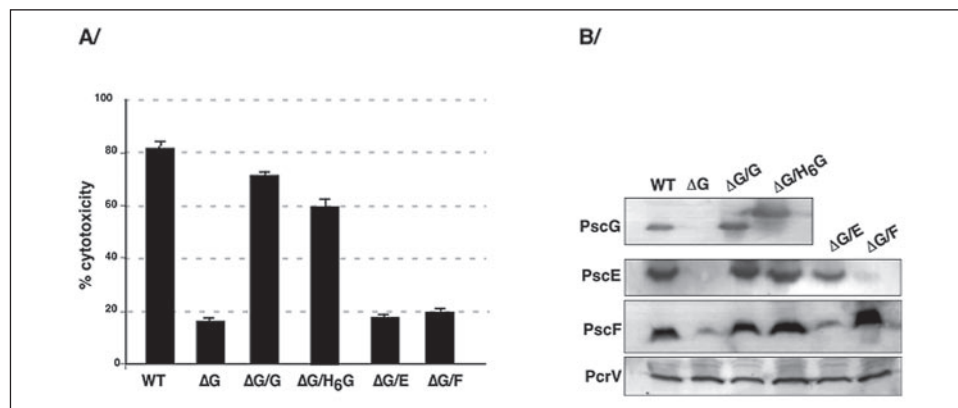
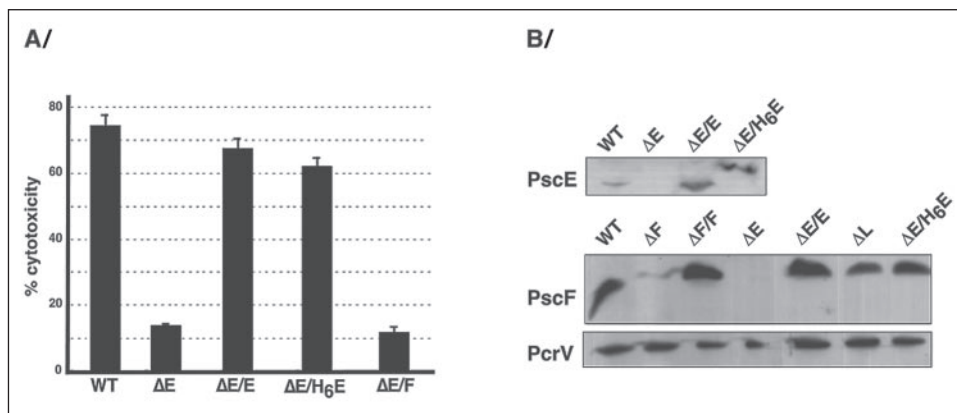


FIGURE 5. Role of PscG in type III cytotoxicity and PscF-needle assembly. *A*, the cytotoxicity of *P. aeruginosa* strains lacking PscG is reminiscent of that of strains lacking PscE, as shown in Fig. 4. *B*, cell extracts from indicated *P. aeruginosa* strains were analyzed as described for Fig. 4*B*, with anti-PscG, anti-PscE, anti-PscF, and anti-PcrV antibodies. Note the low levels of PscF in the PscG-deficient mutant (ΔG). Note also that the introduction of *pscE* and *pscF* in *trans* restored the intracellular levels of PscE and PscF proteins, but did not restore cytotoxicity.

quently, *P. aeruginosa* CHA and CHA ΔE strains were cultivated in T3S-inducing conditions (48), and crude extracts were analyzed by immunodetection. Notably, a deficiency in PscE resulted in the complete absence of PscF within the bacterial cytoplasm, strongly suggesting that, in the absence of PscE, PscF is rapidly degraded (Fig. 4*B*). It has been previously suggested that needle components are eliminated if they cannot be exported from the bacterium, as shown for MxiH and PrgI in secretion-deficient *Shigella* and *Salmonella* strains, respectively (23, 51). Thus, PscF stability in the absence of secretion was tested in a secretion-deficient mutant strain, that lacks PscL, a protein suggested to participate in the control of the T3S ATPase (CHA $\Delta pscLTn5$ (ΔL) (52)). The presence of PscF in the non-secretory strain at levels comparable to the wild-type levels suggests that its degradation in CHA ΔE (Fig. 4*B*) is directly related to the absence of PscE and not to unspecific degradation. To further examine the role of PscE, we introduced several copies of *pscF* in the CHA ΔE mutant strain in *trans* and analyzed transformed cells by Western blotting ($\Delta E/F$, see Fig. 6). Notably, PscF was then easily detected in the *P. aeruginosa* cytoplasm, but was not able to rescue non-secretory and non-cytotoxic phenotypes (Fig. 4*A*), indicating that PscE is required for PscF export and/or needle formation.

To investigate the function of PscG, the third partner in the ternary complex, in needle biogenesis, a *pscG* knock-out strain was generated in a *P. aeruginosa* CHA background (CHA ΔG). CHA ΔG was non-cytotoxic on infected macrophages, and this phenotype was rescued by complementation with a wild-type *pscG* copy introduced in *trans* (Fig. 5*A*). Steady-state level analyses of PscF in CHA ΔG and complemented strains, performed by immunoblotting, revealed that PscF levels were severely diminished in the *pscG* knock-out (Fig. 5*B*). Of note, the *pscG*

deletion also affected the levels of PscE. However, synthesis of PscE in *trans* was not sufficient to restore T3S functionality (Fig. 5). Similarly, in the CHA ΔE strain, no PscG protein could be detected, an indication that the two PscF partners co-stabilize each other (Fig. 6, *cytoplasm*).

As observed for PscF in the CHA ΔE strain, expression of *pscF* in *trans* in CHA ΔG , restored high levels of intracellular PscF, but did not permit the strain to regain secretion and cytotoxicity capabilities (Fig. 5*A*). Therefore, PscG and PscE seem to be required for the assembly of PscF into a functional, cell-surface-localized secretory channel.

Because PscF could be produced in CHA ΔE and CHA ΔG mutants, but the system was incapable of displaying T3S-dependent toxicity, we verified whether PscF is able to be exported by immunoanalyzing surface-detached appendices. Samples containing detached needles from wild-type *P. aeruginosa* obtained by gently washing the cells, followed by ultracentrifugation, displayed large amounts of PscF (Fig. 6). In the *pscE* and *pscG* knock-out strains producing PscF extrachromosomally, even though it was detected in the cytoplasm, no PscF was detected in semi-purified samples of cellular appendages (Fig. 6). These results confirm that, in the absence of its partners, PscF, even when expressed in *trans*, is not able to be secreted and remains within the cytoplasmic compartment, possibly as a polymerized molecule. It is of interest that an immunolocalization assay of PscE and PscG (Fig. 6) revealed that they could not be detected in the PscF-needle fraction, indicating that they play their roles strictly within the cytoplasmic compartment.

PscE and PscG Block the Energetically Favorable Polymerization of PscF—To understand the role played by PscE and PscG in the stabilization process of PscF, we produced and purified both molecules individually as His-tagged fusions, and constructed *pscE-pscF* and *pscF-pscG*

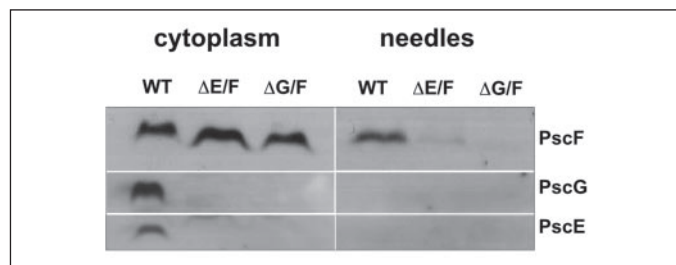


FIGURE 6. **Surface needle assembly requires cytoplasmic PscE and PscG.** Western blot analysis of cytoplasmic and detached needle fractions obtained from *P. aeruginosa* CHA as well as CHAΔE and CHAΔG expressing *pscF* in *trans* (ΔE/F and ΔG/F). Note the absence of PscG and PscE from needle fractions.

bicistronic vectors to attempt to produce the binary complexes in *E. coli*. Individually prepared PscE and PscG displayed low solubility (<5 mg/ml), and neither binary complex could be isolated (data not shown). Notably, a PscE-PscG complex could be isolated by gel-filtration techniques by mixing equimolar quantities of each of the purified proteins, indicating that these two macromolecules interact directly. This complex was more soluble than its individual components (up to ~20 mg/ml). Interestingly, the PscE-PscF-PscG ternary complex could be concentrated to >100 mg/ml, suggesting that all three proteins are required for optimal solubility.

Circular dichroism spectroscopy measurements showed that PscG, PscE, and the PscE-PscG and PscE-PscF-PscG complexes are all predominantly helical (not shown). Subsequent thermal denaturation experiments performed by following the change in ellipticity at 222 nm revealed sigmoidal, cooperative, two-state compatible folding transitions for all four molecules/complexes, with transition temperatures of 52 °C (PscG), 53 °C (PscE), 62 °C (PscE-PscG), and 64 °C (PscE-PscF-PscG) (Fig. 7). The less precise sigmoidal nature of the curves for PscG and PscE suggests that, when on their own, they may be less stable than the binary or ternary complexes (Fig. 7). These results indicate that, as the number of partners in the complex increases, so does macromolecular stability. Notably, unfolding and refolding curves, as well as circular dichroism spectra before and after heating, were superimposable in all four cases. This suggests not only that PscG, PscE, PscE-PscG, and PscE-PscF-PscG are able to fold autonomously, but also that their respective unfolding and refolding pathways are identical.

In contrast, although PscF could also be shown to be mostly helical, no clear endotherm indicative of a cooperative melting behavior could be observed (Fig. 7). Considering these results in conjunction with those described above, it is possible to conclude that PscF, once released from the ternary complex, adopts a lower energetic state by polymerizing into a robust, highly stable structure, whose polymeric nature cannot be modified either by physical stress or by binding to PscE or PscG.

DISCUSSION

The T3S needle is an essential structure that is believed to serve as a secretion channel/conduit for bacterial effectors from the cytoplasm into the target cell cytosol. Although many of the proteins that are conserved within T3S systems of different bacteria also display sequence similarity to macromolecules that make up the basal body of the flagellum, this is not the case for the needle subunits, which display no sequence similarity to flagellar building blocks (4, 53). In all species studied to date, the T3S needle is believed to be formed by a single polymerized molecule. In this work, we have demonstrated that the major component of the T3S needle in *P. aeruginosa*, PscF, polymerizes mostly into elongated (>1 μm) needle-like structures of 8 nm in diameter when expressed on its own; in addition, it can also form shorter

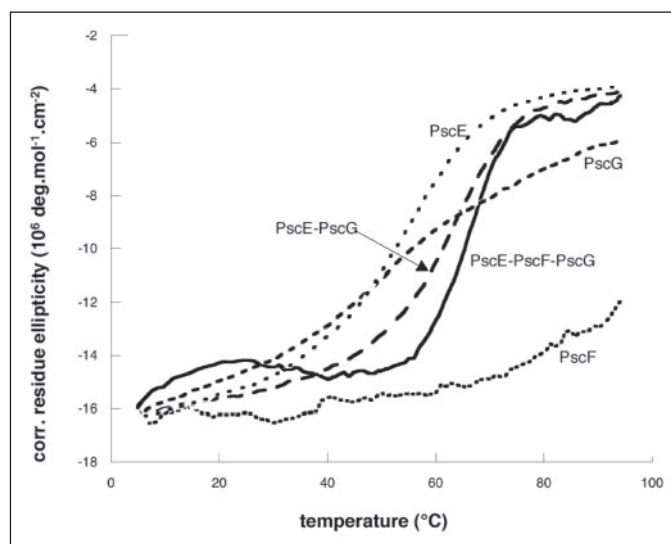


FIGURE 7. **Thermal denaturation curves obtained by circular dichroism for PscE, PscF, PscG, PscE-PscG, and PscE-PscF-PscG.** T_m values increase according to the number of partners in the complex. No clear thermal transition occurs for PscF. All transitions are reversible. The starting values of the measured ellipticity of the molecules were adjusted to that of PscE-PscF-PscG for better visualization of the overlaid curves.

fibrous intermediates (Fig. 2), which can either represent forms whose polymerization was interrupted, or intermediate forms generated by sonication during the purification process. Because the length of the PscF needle has been reported as being ~80 nm (42), this work shows that in the presence of a large amount of PscF subunits and in the absence of an adjuvant molecule, which could regulate needle length, the size of the PscF polymers cannot be controlled. Loss of needle length control has been reported in *Shigella* mutants that overexpress MxiH or lack Spa32, as well as in *Salmonella* mutants that lack InvJ (9, 21, 50). Spa32 and InvJ have been likened to the flagellar protein FliK, which acts as a controller of the length of the flagellar hook structure in the flagellum hook/basal-body complex (53, 54). In *Yersinia*, the function of “molecular ruler” is played by YscP, which regulates the length of the YscF needle (26). Tight control of T3S needle length is crucial for cytotoxicity and infectivity (25), and it is conceivable that, in the *P. aeruginosa* system, needle length control is regulated by the homologous PscP protein, as suggested recently by Cornelis and co-workers (55).

Although other fiber-forming molecules whose sequences are not related to that of the T3S needle also require cytoplasmic stabilization to prevent early polymerization, such as flagellin, FimC, and EspA, these molecules remain in monomeric form in the presence of a single chaperone (32, 36, 56). In the T3S system of *P. aeruginosa*, two distinct bodyguards, PscE and PscG, are essential for stabilizing PscF, as demonstrated by co-purification experiments and phenotypic analyses of knock-out mutants. PscE, PscF, and PscG form a stable, 1:1:1 complex, as verified by mass spectrometry, gel filtration, and circular dichroism melting scans. PscE has counterparts in *Yersinia* sp. (YscE) and *Salmonella* sp. (SsaE), although no obvious candidates could be identified in *Shigella* (Fig. 1B). Sequence alignments of PscG reveal that this acidic molecule shares 47% similarity with YscG from *Yersinia* sp., but sequence homologues could not be found in either *Salmonella* or *Shigella* sp. However, T3S loci in those pathogens harbor several small open reading frames of unknown function, which could fulfill the roles played by PscE and PscG.

PscE and PscG are absolutely essential for PscF functionality *in vivo*. *P. aeruginosa* PscG and PscE knock-out strains both lack PscF and are

consequently non-cytotoxic; both cytotoxicity and PscF levels are re-established upon complementation with the wild-type *pscG* and *pscE* genes introduced in *trans*. In addition, PscF export from the *P. aeruginosa* cytoplasm toward the bacterial surface cannot be accomplished in the absence of PscE and PscG in mutants where PscF is encoded in *trans* (Fig. 6). In this case, it is conceivable that free PscF polymerizes within the cytoplasmic compartment, thus not being able to be exported through the T3S basal body. Interestingly, PscE and PscG form a stable complex, which can be purified by gel filtration and whose thermodynamic stability is greater than that of the individual macromolecules (Fig. 7). This suggests that the PscE-PscG binome could function as a "PscF-stabilizing unit" in the *P. aeruginosa* cytoplasm. In addition, PscE and PscG seem to co-stabilize each other, because PscE was absent in the *pscG*-deleted mutant strain and *vice versa*. It is of note that an interaction between *Y. pestis* YscE and YscG (Fig. 1B) was identified by two-hybrid technology (57), suggesting that this complex is also present in the *Yersinia* system.

The PscF needle-like polymer is thermodynamically stable, because no clear T_m value could be identified for the polymerized molecule and a clear helical signal could be measured before unfolding and after refolding of PscF (Fig. 7). Thus both PscE and PscG capture PscF subunits within the cytoplasm with the goal of blocking an energetically favorable, but highly disadvantageous, intracytoplasmic polymerization of PscF. The fact that PscE-PscF-PscG is more stable than PscE-PscG (Fig. 7) suggests that, within the complex structure, PscF is at least partly folded. It is of interest that in the case of the adhesive type 1 pilus, chaperone-subunit complexes have been suggested as being highly unstable in solution, with chaperones acting as folding platforms and trapping subunits in a molten globule-like conformation (58). The thermodynamic stability of the PscE-PscF-PscG complex presented here argues against a molten globule-like structure. In fact, the reversibility and cooperative nature of unfolding/refolding temperature-scanning curves for PscE-PscF-PscG indicate that, once the ternary complex is unfolded, refolding is able to occur through the same pathway, and that, in this case, PscF remains associated to PscE and PscG. Taken together, these observations suggest that, in *P. aeruginosa*, once PscF is stably trapped by PscE and PscG, an external event must take place to aid it in becoming dissociated from its bodyguards; this event could include interaction with another T3S protein located within the basal body, as is the case of flagellar axial proteins, which are targeted to the Flil-FliH flagellar export complex prior to secretion (34). This is also the case for the CesT chaperone of enteropathogenic *E. coli*, which brings its substrate, Tir, to the ATPase (EscN), located at the base of the T3S machinery (33). Future genetic and biochemical studies should determine if either of the two ternary complex partners is responsible for interaction of PscF with the basal body of the *P. aeruginosa* secretion apparatus.

Acknowledgments—We thank Patrick Méresse (HybrIsère, Grenoble) for polyclonal antibody production, members of the Institut de Biologie Structurale LCM laboratory for helpful discussions, and Otto Dideberg for continuous, enthusiastic support.

REFERENCES

- Hueck, C. J. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433
- Cornelis, G. R., and Van Gijsegem, F. (2000) *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 735–774
- Pallen, M. J., Beatson, S. A., and Bailey, C. M. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 201–229
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3027–3030
- Galan, J. E., and Collmer, A. (1999) *Science* **284**, 1322–1328
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E., and Aizawa, S. I. (1998) *Science* **280**, 602–605
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., and Allaoui, A. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 652–663
- Kimbrough, T. G., and Miller, S. I. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11008–11013
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S., and Sasakawa, C. (2000) *EMBO J.* **19**, 3876–3887
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E., and Unger, V. M. (2004) *Science* **306**, 1040–1042
- Cordes, F. S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E. H., Blocker, A., and Lea, S. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17103–17107
- Hoiczky, E., and Blobel, G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4669–4674
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., and Abe, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11638–11643
- Li, C. M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M., and Taira, S. (2002) *EMBO J.* **21**, 1909–1915
- Jin, Q., and He, S. Y. (2001) *Science* **294**, 2556–2558
- Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E. E., Rosqvist, R., Homble, F., and Wolf-Watz, H. (1996) *EMBO J.* **15**, 5812–5823
- Tardy, F., Homble, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G. R., Ruyschaert, J. M., and Cabiaux, V. (1999) *EMBO J.* **18**, 6793–6799
- Neyt, C., and Cornelis, G. R. (1999) *Mol. Microbiol.* **33**, 971–981
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H., and Schmidt, M. A. (2001) *Cell. Microbiol.* **3**, 669–679
- Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., and Dessen, A. (2003) *EMBO J.* **22**, 4957–4967
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I., and Galan, J. E. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10225–10230
- Stebbins, C. E., and Galan, J. E. (2001) *Nature* **414**, 77–81
- Sukhan, A., Kubori, T., Wilson, J., and Galan, J. E. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 1159–1167
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B. B., Miller, S. I., and Strynadka, N. C. (2005) *Nature* **435**, 702–707
- Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C., and Cornelis, G. R. (2005) *Science* **307**, 1278
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G. R. (2003) *Science* **302**, 1757–1760
- Cheng, L. W., and Schneewind, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22102–22108
- Wattiau, P., Woestyn, S., and Cornelis, G. R. (1996) *Mol. Microbiol.* **20**, 255–262
- Frithz-Lindsten, E., Rosqvist, R., Johansson, L., and Forsberg, A. (1995) *Mol. Microbiol.* **16**, 635–647
- Rosqvist, R., Persson, C., Hakansson, S., Nordfeldt, R., and Wolf-Watz, H. (1995) *Contrib. Microbiol. Immunol.* **13**, 230–234
- Luo, Y., Bertero, M. G., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Wenk, M. R., Creagh, L., Marcus, S. L., Lim, D., Sicheri, F., Kay, C., Haynes, C., Finlay, B. B., and Strynadka, N. C. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1031–1036
- Yip, C. K., Finlay, B. B., and Strynadka, N. C. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 75–81
- Gauthier, A., and Finlay, B. B. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 6747–6755
- Thomas, J., Stafford, G. P., and Hughes, C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3945–3950
- Parsot, C., Hamiaux, C., and Page, A. L. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 7–14
- Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G. M., and Hughes, C. (2001) *J. Mol. Biol.* **308**, 221–229
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2000) *Microbes Infect.* **2**, 1051–1060
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2002) *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 194–222
- Berthelot, P., Attree, I., Plesiat, P., Chabert, J., de Bentzmann, S., Pozzetto, B., and Grattard, F. (2003) *J. Infect. Dis.* **188**, 512–518
- Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N. S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W., and Wiener-Kronish, J. P. (2001) *J. Infect. Dis.* **183**, 1767–1774
- Sawa, T., Ohara, M., Kurahashi, K., Twining, S. S., Frank, D. W., Doroques, D. B., Long, T., Gropper, M. A., and Wiener-Kronish, J. P. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 3242–3249
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. (2005) *FEMS Microbiol. Lett.*, in press
- Swietnicki, W., Powell, B. S., and Goodin, J. (2005) *Protein Expr. Purif.* **42**, 166–172
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999) *Infect. Immun.* **67**, 6164–6167
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., and Olson, M. V. (2000) *Nature* **406**, 959–964
- Schweizer, H. P. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 1195–1204
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and Attree, I. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 4741–4750
- Yahr, T. L., Mende-Mueller, L. M., Friese, M. B., and Frank, D. W. (1997) *J. Bacteriol.*

Biogenesis of the Type III Secretion Needle in *P. aeruginosa*

- 179, 7165–7168
49. Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001) *Mol. Microbiol.* **40**, 76–85
50. Magdalena, J., Hachani, A., Chamekh, M., Jouihri, N., Gounon, P., Blocker, A., and Allaoui, A. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 3433–3441
51. Jouihri, N., Sory, M. P., Page, A. L., Gounon, P., Parsot, C., and Allaoui, A. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**, 755–767
52. Dacheux, D., Epaulard, O., de Groot, A., Guery, B., Leberre, R., Attree, I., Polack, B., and Toussaint, B. (2002) *Infect. Immun.* **70**, 3973–3977
53. Ghosh, P. (2004) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 771–795
54. Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S. I., and Macnab, R. M. (1998) *J. Mol. Biol.* **277**, 871–882
55. Agrain, C., Callebaut, I., Journet, L., Sorg, I., Paroz, C., Mota, L. J., and Cornelis, G. R. (2005) *Mol. Microbiol.* **56**, 54–67
56. Choudhury, D., Thompson, A., Stojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S. J., and Knight, S. D. (1999) *Science* **285**, 1061–1066
57. Day, J. B., Guller, I., and Plano, G. V. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 6466–6471
58. Zavialov, A. V., Berglund, J., Pudney, A. F., Fooks, L. J., Ibrahim, T. M., MacIntyre, S., and Knight, S. D. (2003) *Cell* **113**, 587–596
59. Konyecsni, W. M., and Deretic, V. (1988) *Gene (Amst.)* **74**, 375–386

Publication 2

Quinaud, M., Ple, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J.P., Attree, I.
et Dessen, A.

Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle
formation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2007) **104**, 7803-7808.

Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation

Manuelle Quinaud*, Sophie Plé†, Viviana Job*, Carlos Contreras-Martel*, Jean-Pierre Simorre*, Ina Attree†‡, and Andréa Dessen**

*Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41 Rue Jules Horowitz, Unité Mixte de Recherche 5075, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, 38027 Grenoble, France; and †Institut de Recherches en Technologie et Sciences pour le Vivant, Unité Mixte de Recherche 5092, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, 38054 Grenoble, France

Edited by John Kuriyan, University of California, Berkeley, CA, and approved March 21, 2007 (received for review November 14, 2006)

Type III secretion systems (T3SS), found in several Gram-negative pathogens, are nanomachines involved in the transport of virulence effectors directly into the cytoplasm of target cells. T3SS are essentially composed of basal membrane-embedded ring-like structures and a hollow needle formed by a single polymerized protein. Within the bacterial cytoplasm, the T3SS needle protein requires two distinct chaperones for stabilization before its secretion, without which the entire T3SS is nonfunctional. The 2.0-Å x-ray crystal structure of the PscE-PscF^{55–85}-PscG heterotrimeric complex from *Pseudomonas aeruginosa* reveals that the C terminus of the needle protein PscF is engulfed within the hydrophobic groove of the tetratricopeptide-like molecule PscG, indicating that the macromolecular scaffold necessary to stabilize the T3SS needle is totally distinct from chaperoned complexes between pilus- or flagellum-forming molecules. Disruption of specific PscG–PscF interactions leads to impairment of bacterial cytotoxicity toward macrophages, indicating that this essential heterotrimer, which possesses homologs in a wide variety of pathogens, is a unique attractive target for the development of novel antibacterials.

bacterial pathogenicity | chaperones | x-ray crystallography

Type III secretion systems (T3SS) are protein-secretion machineries that have been linked to the transport of virulence effectors from the cytosol of a variety of Gram-negative pathogens directly into the host cell cytoplasm. Although many of the protein components of T3SS from different microorganisms share considerable structural and functional similarities, transported effectors are bacterium-dependent and play a variety of subversive roles that range from induction of apoptosis to the suppression of host defense mechanisms (1–3). As a consequence, pathogens that harbor T3SS cause a wide diversity of diseases, including plague (*Yersinia pestis*), typhoid fever (*Salmonella typhi*), and bacillary dysentery (*Shigella dysenteriae*). *Pseudomonas aeruginosa*, a major nosocomial bacterium whose pathogenesis highly depends on a functional T3SS (4, 5), is the causative agent of opportunistic infections in neutropenic and other immunocompromised individuals as well as in severe burn victims. In addition, *P. aeruginosa* is the primary cause of chronic infections in ventilator-assisted and cystic fibrosis patients and ultimately leads to loss of lung function and death in the latter group (6). The natural resistance of *P. aeruginosa* to a broad range of antibiotics, as well as its widespread presence in hospital settings worldwide, has proven to be a challenge necessitating the search for yet-unexplored antibacterial development targets.

The injectisome, a key component of the T3SS, is composed of membrane-embedded protein rings extended by a hollow needle formed by a single polymerized protein. It is widely accepted that the T3SS needle could be the conduit through which effectors and toxins are exported, although other paths for effector transport are still possible (2, 7–9). The T3SS needle protein is synthesized in the bacterial cytoplasm but polymerizes only after secretion to the bacterial surface, following a highly

regulated sequence of events (8, 10–13). Thus, within the bacterial cytoplasm, the T3SS needle-forming protein must be prevented from undergoing self-assembly, while at the same time being primed for secretion and subsequent polymerization into a T3SS-effector-permissive conduit. T3SS needle-forming proteins have been shown to be highly helical in nature, and an elegant model of the T3SS needle from *Shigella flexneri*, which combines a 17-Å electron microscopy map onto which the crystal structure of the needle-forming monomer was modeled, suggests that self-assembly occurs through head-to-tail association of the monomers (14, 15).

In *P. aeruginosa*, the T3SS needle is formed by polymerized PscF, an 85-residue protein that displays sequence similarity to T3SS needle-forming proteins from other major pathogens, such as YscF from *Y. pestis* (69%). PscF is found in the bacterial cytoplasm uniquely within a soluble heterotrimeric complex with two partners, PscE and PscG; clinical isolates mutated to lack either one of these two molecules are viable but noncytotoxic (16). Interestingly, homologs of PscE and PscG exist in a variety of pathogens (Fig. 1), suggesting that, unlike pili, flagella, or even other T3SS-associated filaments, the complexity of the T3SS needle formation mechanism requires that the needle protein be stabilized by two distinct partners. To define the mechanism and structural requirements for T3SS needle protein stabilization within the bacterial cytoplasm, we solved the structure of the PscE-PscF^{55–85}-PscG complex from a clinical strain of *P. aeruginosa* (CHA) to 2.0-Å resolution. PscG and PscE fold in the form of a cupped hand that stabilizes the highly amphipathic C-terminal helix of PscF, whose hydrophobic face plays a key role in T3SS needle polymerization and stability. Strains in which the PscG–PscF recognition platform was mutated show dramatically decreased cytotoxicity profiles, revealing that the T3SS needle stabilization ternary complex is a previously undescribed, tractable macromolecular target for the development of new antibacterials applicable against a wide variety of pathogens.

Results and Discussion

A Complex Unique System to Stabilize the T3SS Needle Protein. Crystals of the heterotrimeric complex (PscE^{1–67}-PscF^{1–85}-PscG^{1–115}), in which all three proteins were expressed in full-

Author contributions: I.A. and A.D. designed research; M.Q., S.P., V.J., C.C.-M., J.-P.S., I.A., and A.D. performed research; M.Q., V.J., I.A., and A.D. analyzed data; and A.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: T3SS, type III secretion systems; TPR, tetratricopeptide.

Data deposition: The atomic coordinates listed in this paper have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID code 2UWJ).

†To whom correspondence may be addressed. E-mail: ina.attree-delic@cea.fr or andrea.dessen@ibs.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0610098104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

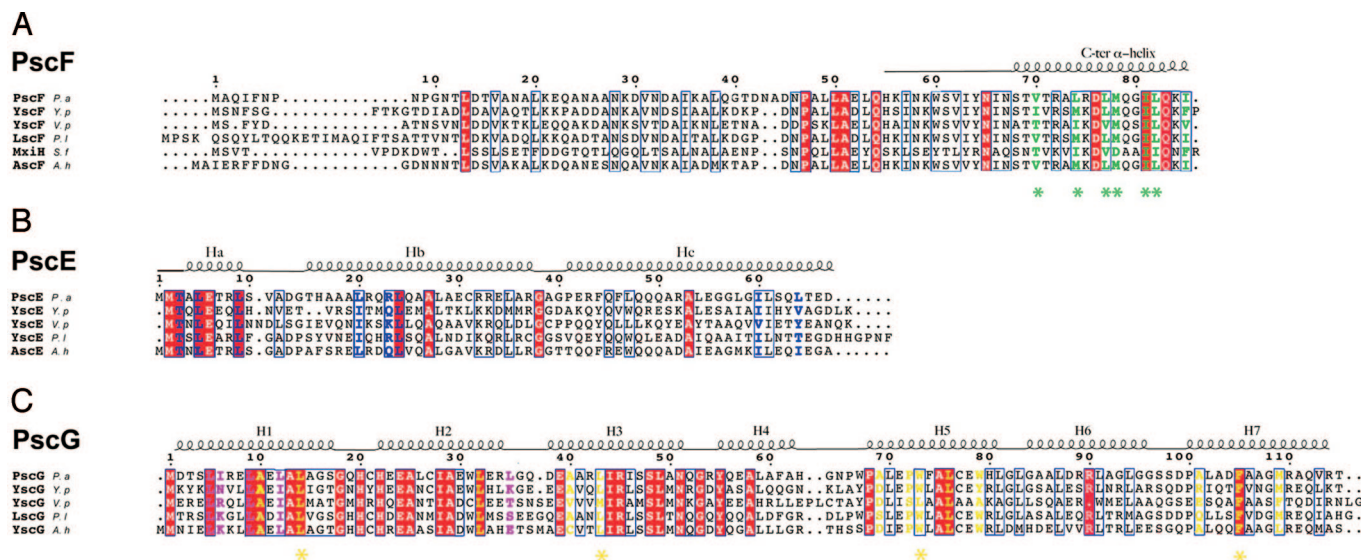


Fig. 1. Structure-based sequence alignment of T3SS needle proteins and their cytoplasmic partners from diverse pathogens. (A) PscF from *P. aeruginosa* (causative agent of nosocomial infections), YscF from *Y. pestis* (bubonic plague), YscF from *Vibrio parahaemolyticus* (gastrointestinal illness), LscF from *Photobacterium luminescens* (insect pathogen), MxiH from *S. flexneri* (bacillary dysentery), and AscF from *Aeromonas hydrophila* (respiratory illness in humans, reptiles, and birds). Residues mutated in this study and shown to be involved in polymerization and needle stability are highlighted with stars, whereas those which interact with PscF are shown in green. (B) PscE homologs from bacteria described above share a major homology region within their N-terminal domains. PscE residues which interact with PscG are shown in blue. (C) PscG homologs share high conservation within residues which interact with PscE (purple) and PscF (yellow). Residues mutated to Ser in this study are indicated with stars.

length form and in tandem from the *pscEFGHI* section of the *exsD-pscBCDEFGHIJKL* *P. aeruginosa* operon in an *Escherichia coli* system (16), diffracted only to 7 Å. However, papain treatment of the heterotrimer yielded a stable complex in which PscE and PscG remained intact, but the first 54 residues of PscF were removed, suggesting that this region could be inherently flexible. The PscE-PscF^{55–85}-PscG complex yielded crystals that diffracted to 2.0 Å, and structure solution was accomplished by performing a single anomalous dispersion experiment by using the scattering of 3 Ni²⁺ ions introduced into the crystallization solution.

The structure of PscE-PscF^{55–85}-PscG reveals that stabilization of the T3SS needle protein requires a macromolecular system that is totally distinct from what has been described for other fiber-forming molecules, such as the flagellum, the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) T3S-associated filament or various pili (17–19); in addition, it does not display any similarity with other T3SS-chaperone complexes reported to date (20). PscG displays a seven-helical array harboring three helix-turn-helix motifs (H1–H6) that are highly reminiscent of a tetratricopeptide (TPR) domain [green in Fig. 2A and supporting information (SI) Fig. 5], although a TPR fold for PscG was not predicted from sequence analyses. The concave surface of PscG, formed by helices 1, 3, 5, and 7, displays a highly hydrophobic platform (green in Fig. 2B and C), which “grasps” the C-terminal helix of PscF^{55–85} (red in Fig. 2). Each PscG helix provides between one and two residues to the interaction region, with Leu 14, Leu 43, Trp 73, and Phe 105 playing central roles (Fig. 2C; see below). PscG also interacts intimately with PscE (blue in Fig. 2) through a hydrophobic platform formed by the outside faces of H1 and H2 (Fig. 2A). In this sense, PscG represents an unusual TPR-like molecule, since both its convex and concave faces are used for partner molecule recognition.

The presence of an interaction platform between PscG and PscE reflects the fact that, both *in vitro* and *in vivo*, PscE serves as a stabilizing element for PscG (and vice versa). *P. aeruginosa* strains that lack chromosomally encoded *pscE* are incapable of producing PscG stably; the same occurs in *pscG*-deleted strains,

which lack PscE and, in both cases, strains are noncytotoxic. In addition, PscE and PscG can be purified *in vitro* as a 1:1 complex that is more stable than isolated PscE or PscG (16). PscE folds into two antiparallel helices, Hb and Hc, that are preceded by a short independent helix (Ha). Hc and Hb are lined with hydrophobic residues within their common interacting region; all three helices associate onto PscG’s hydrophobic surface (Fig. 2B and C). Notably, the only PscE residue that interacts with PscF is Met 2, which precedes the highly conserved Ha helix, protruding deeply into a largely hydrophobic cleft formed by PscF residues Met 78, Trp 60, and Ile 63 (Fig. 2B). Thus, the fold of the PscE-PscG complex is reminiscent of a cupped hand, with the concave side of PscG representing the “palm.” Interestingly, the homologs of PscE and PscG in *Y. pestis* (YscE and YscG, respectively) have been shown to interact by two-hybrid screening (21), revealing the prevalence of this interaction amongst different bacterial species.

Needle Protein Amphipathicity Is Guaranteed Through TPR Recognition. PscF^{55–85} is composed of two subdomains: an extended coil (PscF^{55–67}), which is the continuation of the flexible N terminus that was removed by proteolysis before crystallization, and a C-terminal 17-residue, 25-Å-long α -helix (PscF^{68–85}) (Figs. 2 and 3A). The extended coil interacts with the PscG palm through hydrophobic residues Trp 60, Val 62, Ile 63, and Ile 66 (Fig. 2B). The C-terminal, PscF^{68–85} helix is essential for polymerization of the full-length PscF, because a mutant lacking this region, PscF^{1–67}, behaves as a monomer in gel filtration (SI Fig. 6) and chemical cross-linking experiments (not shown); the C-terminal region of the needle protein has also been shown to be essential for needle assembly in other T3S systems, as well as in the flagellar filament (15, 22, 23). In addition, PscF^{68–85} is highly amphipathic. The side of the helix that is stably embedded within the PscG palm is lined with hydrophobic residues (Figs. 2B and 3A), which are well conserved among a variety of bacterial species (Fig. 3D), forming a nonpolar platform that involves a total of 16 amino acids coming from both proteins. In contrast, the face that points to the outside of the PscE-PscG hand is

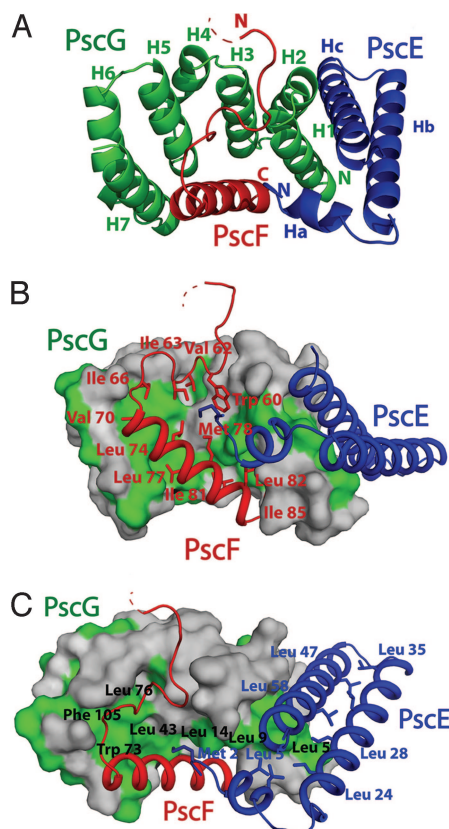


Fig. 2. Formation of the PscE-PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG heterotrimer involves different platforms of hydrophobic interactions. (A) The seven-helical TPR-like structure of PscG (green) stabilizes PscF⁵⁵⁻⁸⁵ (red) through its concave side and interacts with PscE (blue) by using its convex face. (B) Hydrophobic residues that line PscF (red) are stabilized within the concave face of PscG's nonpolar palm (green). Note that PscF residues 60–67, which form an extended coil, are also bound within the palm. (C) A second hydrophobic platform, formed by the outside face of PscG helices H1 and H2, is responsible for recognition of PscE. The antiparallel nature of PscE helices Hb and Hc is also maintained through hydrophobic interactions.

highly hydrophilic. Thus, PscG's helix H7 interacts with PscF's Val 70 and Leu 77, H5 with Leu 74, Leu 77, Met 78 and Ile 81, H3 with Ile 81 and Ile 85, and H1 with Leu 82 and Ile 85.

The stabilization of the C terminus of PscF within the grasp of an interaction platform generated by a TPR domain starkly deviates from structures of other fiber-forming molecules. The complex between a fragment of flagellin (FliC) and its chaperone FliS, reveals that, contrary to PscF, flagellin wraps itself around FliS in extended conformation and is highly exposed to solvent (17) (SI Fig. 7). Similarly, EspA, the building block of the EPEC T3SS-associated filament, also associates itself only laterally with its chaperone CsaA through coiled coil interactions (SI Fig. 7; ref. 18). These distinct modes of binding point to the necessity of securing the T3SS needle protein within a stable cleft, which is provided by the scaffold provided by PscG and PscE.

Electron microscopy images of the bacterial flagellar filament, type III needle, and type IV pilus have revealed that the assembly of these structures involves packing of protein subunits within longitudinal helical arrays; in the case of the flagellum and type IV pilus, hydrophobic interactions have been shown to play key roles in the maintenance of the mechanical infrastructure (14, 23–25). These observations prompted us to investigate whether hydrophobic amino acids on the amphipathic C terminus of PscF could play a similar role in T3SS needle polymer-

ization. To test this hypothesis, we mutated nonpolar residues aligned on the PscF⁶⁹⁻⁸⁵ helical axis to Lys (V70/I77; L74/I81; M78/L82; Fig. 3A) in the context of full-length PscF and tested purified proteins for their ability to self-assemble into stable polymers with size exclusion chromatography (SI Fig. 6) and melting temperature circular dichroism assays (Fig. 3B). Contrary to wild-type PscF, which when expressed on its own, polymerizes spontaneously and is a thermodynamically stable molecule (Fig. 3B and ref. 16), none of the mutant PscF molecules were able to form stable polymers. All mutants displayed melting transition temperatures of 50°C or lower, contrasting sharply with the robust behavior of wild-type PscF under the same experimental conditions (Fig. 3B). In addition, all three mutants eluted in gel filtration at positions which were intermediate between that of wild-type PscF (void volume) and PscF¹⁻⁶⁷, which was used as a negative polymerization control (SI Fig. 6) and formed heterogeneous oligomeric mixtures, as verified by negative staining electron microscopy (not shown). Thus, much as in the case of the type IV pilus and bacterial flagellum, hydrophobic residues aligned along the polymerization domain of the type III secretion needle-forming protein are responsible for its structural integrity and provide key interactions that ensure its robust nature.

The striking amphipathic character of PscF⁶⁹⁻⁸⁵ also brings into question the role of its hydrophilic face, which is notably decorated with residues Asp 76, Arg 72, and Gln 83 (the two latter residues not being aligned on the helical axis with Asp 76). To investigate their function, we mutated the three residues into Ala, introduced the mutated plasmids into the *P. aeruginosa* CHA strain carrying an endogenous deletion of PscF (ΔF), and tested expression and secretion capabilities of the resulting strains, as well as their cytotoxicity toward macrophages. A *P. aeruginosa* ΔF strain carrying double mutant PscF R72A/Q83A was able to express and secrete T3SS translocator PopB, intoxicating target cells (Fig. 3C). However, a ΔF strain carrying PscF D76A, although able to express PopB at wild-type levels, was unable to secrete effectors at any detectable level; in addition, it displayed a dramatic decrease in cytotoxicity. Interestingly, when a wild-type CHA strain, which carries native PscF, was complemented with the plasmid expressing PscF D76A, PopB secretion was also diminished, and cytotoxicity was $\approx 50\%$ of that displayed by the uncomplemented CHA strain (Fig. 3C, lane 6). The dominant-negative effect displayed by PscF D76A on the *P. aeruginosa* isolate could be a consequence of its incorporation into polymerizing needles concomitantly with wild-type PscF molecules, thus disrupting T3SS needle functionality, although other possibilities cannot be excluded. Notably, mutations in the analogous residues in YscF (Asp 77) and MxiH (Asp 73; Fig. 1) also yielded strains incapable of secreting T3SS effectors or infecting target cells upon induction (22, 26). A model of the MxiH T3SS needle generated by the fitting of the crystal structure of MxiH monomers onto a 17-Å electron microscopy needle reconstruction suggests this residue could be located at the interface between subunits within the polymerized needle (14), which would explain its ability to disrupt normal needle function in strains carrying a mixture of viable and nonviable copies of the needle protein.

A Protein Interaction Region as a Template for Rational Drug Design.

The importance of maintenance of needle protein functionality for bacterial cytotoxicity, as well as the ubiquitous presence and sequence similarity between PscF, PscG, and PscE homologs in a variety of pathogens (Fig. 1), suggest that this ternary complex can be explored as a novel target for the development of new antibacterials. To identify the region in the complex that displays the most susceptibility to disruption, thus being interesting for exploration through targeting by a small molecule, we investigated the importance of both the N terminus of PscE (from Met

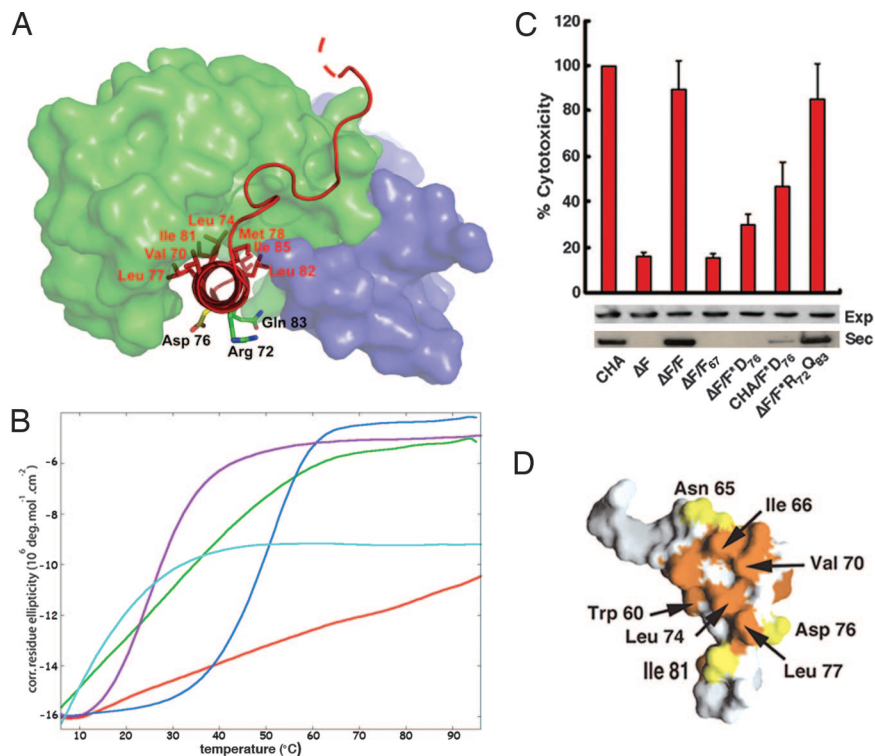


Fig. 3. PscG grasps PscF's amphipathic tail. (A) Hydrophobic residues within the C-terminal helix of PscF (PscF^{68–85}, in red) are shielded within PscG's concave groove, whereas hydrophilic residues point to solvent. PscG and PscE are represented as light green and blue surfaces, respectively. (B) Thermal denaturation curves obtained by circular dichroism measurements of wild-type PscF (red), PscF V70K/I77K (green), PscF L74K/I81K (purple), PscF M78K/L82K (blue), and PscF^{1–67} (light blue). Wild-type PscF is the only molecule that is robustly resistant to thermal denaturation. (C) Cytotoxicity profiles of *P. aeruginosa* strains carrying a *pscF* chromosomal deletion complemented by either wild-type (ΔF/F) or mutant *pscF*-expressing plasmids. Strains complemented by wild-type PscF or PscF R72A/Q83A are as cytotoxic as wild-type (CHA), whereas the one complemented with PscF D76A displays greatly reduced cytotoxicity. Supplying the wild-type strain with PscF D76A generated a dominant-negative effect. Below, Western blots revealing the cytoplasmic expression (exp) and secretion (sec) of T3SS effector molecule PopB in the same strains. Although all strains express PopB in the cytoplasm, only strains carrying either wild-type PscF or PscF R72A/Q83A are able to secrete PopB at levels comparable to the wild-type (CHA) strain. Error bars refer to standard deviation measurements for experiments performed in triplicate. (D) Mapping of PscF residues that are identical (yellow) and similar (orange) within different bacterial species from the point of view of PscG's concave side.

2 to the C terminus of helix Ha) and the concave surface of PscG (the palm), regions that are conserved among a variety of bacterial species (Figs. 1 and 4C), in T3SS functionality and bacterial cytotoxicity.

Four clones harboring mutations or deletions on the N terminus of PscE (PscE M2A, PscE M2H, PscE^{3–67}, and PscE^{12–67}, the latter of which lacks the entire Ha helix) were used to complement a *P. aeruginosa* CHA isolate carrying a *pscE* deletion (ΔE); interestingly, all four strains were fully cytotoxic (SI Fig. 84). In addition, PscE^{12–67}-PscF-PscG could still be purified as a 1:1:1 complex and displayed only a mild decrease in thermostability in circular dichroism temperature scanning assays when compared with full-length PscE-PscF-PscG (SI Fig. 8B). Hence, our results show that the first 11 residues of PscE, albeit the interaction of Met 2 with PscF and the high conservation of residues that interact with PscG, play at most a minor role in T3SS functionality.

Within the PscG palm, four central residues in the PscF-interacting region of PscG (Leu 14, Leu 43, Trp 73, and Phe 105; Fig. 4A) were mutated into Ser, and mutant plasmids were used to complement a *P. aeruginosa* CHA isolate in which *pscG* was deleted (ΔG) (Fig. 4B). In addition, mutant ternary complexes were also expressed and purified in *E. coli* and submitted to thermal denaturation assays (SI Fig. 9). Expression, secretion, and cytotoxicity assays revealed that strains expressing PscG W73S or PscG F105S were ≈50% less toxic toward macrophages than the ΔG strain complemented with wild-type PscG. This result was in accordance with those from thermal denaturation tests, which showed ternary complexes carrying these single

mutations to be less stable than wild type (SI Fig. 9). Notably, double mutants PscG L43S/W73S and PscG W73S/F105S displayed cytotoxicity profiles that were comparable to the background level displayed by the uncomplemented ΔG strain (Fig. 4B, last two lanes). *In vitro*, the ternary complex carrying the L43S/W73S mutations on PscG could not be isolated; after purification, only a 1:1 PscE-PscG complex could be identified (not shown). In addition, Western blots performed with anti-PscG antibodies revealed that the double mutant strains harbor less PscG than other more cytotoxic strains (Fig. 4B), which is most likely due to of the instability of PscG in the absence of PscF. These results corroborate data from previous *in vivo* studies, which showed that the presence and stability of each member of the ternary complex is essential for preservation of the complex as a whole (16). PscG residues Leu 43, Trp 73, and Phe 105 lie on helices H5 and H7 within the concave face of PscG's TPR region, and interact with PscF's Leu 74 and Ile 81, which were shown to play key roles in polymerization and provide thermodynamic stability (see above). Consequently, the disruption of this 770-Å² essential interface strongly affects TTSS functionality.

The sequence similarity observed within PscF, PscG, and PscE homologs suggests that different T3SS-carrying pathogens possess a similar heterotrimeric scaffold that regulates needle protein stabilization before secretion. In addition, the highly conserved PscG-PscF interface (Figs. 3D and 4C), which harbors residues essential for bacterial cytotoxicity, is a potential template for the design of inhibitors capable of disrupting

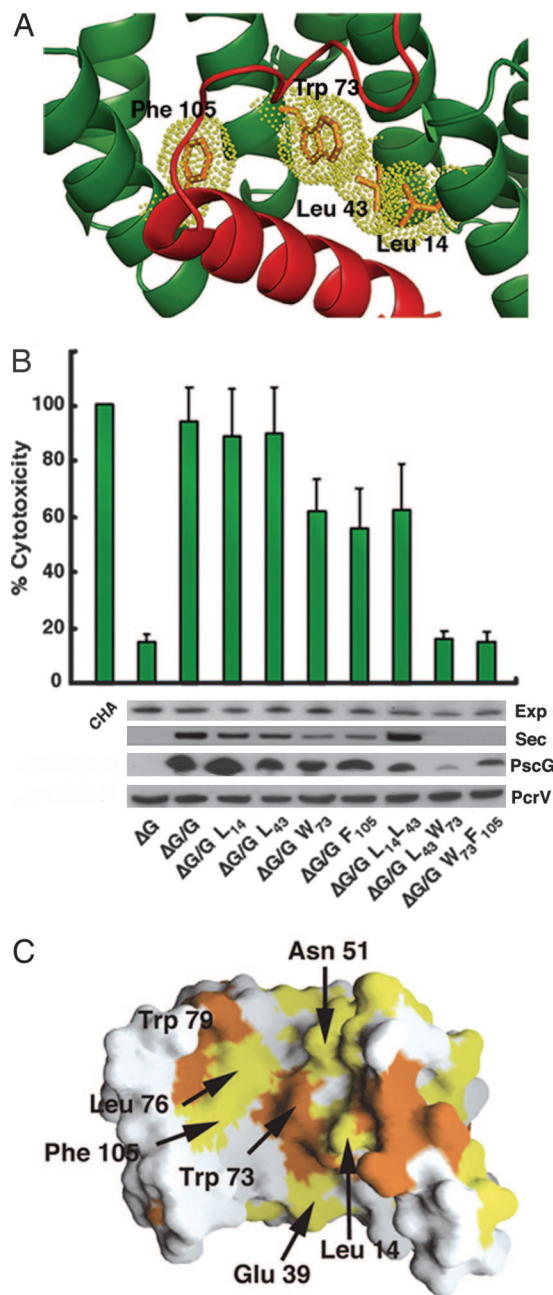


Fig. 4. The PscG–PscF interaction platform is essential for T3SS viability. (A) Closeup of the PscG–PscF interaction region, showing the four hydrophobic residues that were mutated to Ser in this study. (B) Analysis of the effect of PscG mutations on cytotoxicity of the CHA *P. aeruginosa* isolate, from which *pscG* was chromosomally deleted. Strains expressing mutants PscG L43S/W73S and W73S/F105S can express (Exp), but not secrete (Sec), T3SS effector PopB and display only background cytotoxicity. A lower amount of PscG is detected in the cytoplasm of the double-mutant strains, whereas the levels of PcrV, an unrelated T3SS effector, are maintained. (C) Mapping of PscG residues that are identical (yellow) and similar (orange) within different bacterial species, revealing a highly conserved interface.

PscF–PscG interactions. This approach could allow for the development of inhibitors that block T3SS viability without killing the bacterium, making the appearance of drug-resistant strains less likely. Thus, the PscF–PscE–PscG heterotrimeric complex presented here represents a yet-unexplored target for antibiotherapy development.

Experimental Procedures

Sample Preparation, Crystallization, and Data Collection. The full-length PscE^{1–67}–PscF^{1–85}–PscG^{1–115} complex was purified as a 1:1:1 complex as described (16), but high-quality crystals were not obtained. After treating the complex with a 1:1,000 papain:protein ratio for 4 h, three stable bands (PscE^{1–67}, PscF^{55–85}, and PscG^{1–115}) were identified by mass spectrometry and N-terminal sequencing. The DNA sequence corresponding to the first 54 residues of PscF was then removed from the *pscEFG* sequence by performing Slicing Overlap Extension PCR. The final PCR product was introduced into pET-15b (Novagen) and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The new heterotrimeric complex, PscE–PscF^{55–85}–PscG, was purified by using the same protocol as for the full-length form (16), with the exception that the histidine tag was removed with thrombin at a 1:1,000 ratio before gel filtration in 25 mM Hepes, pH 6.7/0.1 M NaCl/1 mM EDTA/10 mM DTT. Crystals were obtained in hanging drops in 100 mM Tris·HCl, pH 7.4/0.8 M LiSO₄/10 mM NiCl₂ at room temperature and were cryoprotected by gradual incubation in increasing amounts of glycerol to a final concentration of 25%. Data sets were collected at the European Synchrotron Radiation Facility beamline ID14-EH2 at 100 K. Crystals belong to space group P6₂22 and contain one heterotrimer per asymmetric unit. All data were processed by using DENZO and SCALEPACK (27).

Structure Determination. Experimental phases were calculated by using the anomalous signal from three Ni²⁺ ions, obtained by collecting data from a single crystal that diffracted to 2.2 Å. The Ni²⁺ sites were located by SHELXD (28) by using the AutoSHARP protocol (29). An interpretable electron density map was obtained after solvent flattening, and the PscE–PscF^{55–85}–PscG model was automatically traced by using ARP/wARP (30). Molecular replacement with AmoRe (31) was performed with this model to phase reflections from a second crystal that diffracted to 2.0 Å. Refinement with CNS (32), which included energy minimization, temperature factor refinement, and simulated annealing steps, was intercalated with iterative cycles of manual model building in COOT (www.ysbl.york.ac.uk/~emsley/coot). Data collection, phasing, and refinement statistics are included in SI Table 1.

Circular Dichroism. Thermodynamic stability assays were performed on a Jasco (Easton, MD) J-810 spectropolarimeter with a 1-mm cell in 20 mM sodium phosphate, pH 7.2/0.1 M NaCl at protein concentrations of 0.2 mg/ml for all samples. The circular dichroism signal was recorded at 222 nm in a range of 4–96°C with scan rate of 1°C per min. Spectra were corrected against those of the buffer reference. The measured ellipticity was adjusted to the same starting value for all samples for a better visualization of the curves.

T3SS Effector Synthesis, Secretion, and Cytotoxicity Assays. PscF mutants V70K/I77K, L74K/I81K, and M78K/L82K were obtained by using the Quick Change mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA), cloned into pET22b (Novagen), transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and purified as wild-type PscF (16). Other PscF and PscG mutants were created by using pIApG/PscF, pIApG/PscE, and pIApG/PscG as templates (16). Mutated plasmids were introduced into a cytotoxic *P. aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA carrying appropriate chromosomal deletions of *pseE*, *pseF*, or *pseG* (ΔE , ΔF , and ΔG , respectively). Mutant and control strains were grown on *Pseudomonas* Isolation Agar (Difco, Lawrence, KS) plates or in liquid Luria Broth (LB) at 37°C with agitation. Carbenicillin was used at 500 μ g/ml

for *Pseudomonas* Isolation Agar plates and 300 $\mu\text{g/ml}$ in LB. For induction of type III secretion *in vitro*, *P. aeruginosa* overnight cultures were diluted to an optical density at 600 nm (A_{600}) of 0.2 in LB containing 5 mM EGTA and 20 mM MgCl_2 . Incubation was prolonged for additional 3 h until the cultures reached A_{600} values of 1.0. The samples containing 30 μl of culture supernatants or total cells were directly analyzed by Western blotting by using anti-PopB, anti-PcrV, or anti-PscG antibodies. For cytotoxicity assays, the bacteria were cultivated to an OD_{600} of 1 and added to macrophage cell line J774 at a Multiplicity of Infection of 5. Cell death was assessed at 3 h postinfection by using a

Cytotoxicity Detection Kit, LDH (Roche, Indianapolis, IN). All tests were performed in triplicate.

We thank Otto Dideberg for continuous support, Guy Schoehn and the CIBB electron microscopy platform for help with negative staining analyses, and laboratory members for helpful discussions. This work was supported by grants from the French Cystic Fibrosis Foundation (Vaincre la Mucoviscidose) and the Direction des Sciences du Vivant (DSV/Commissariat à l'Energie Atomique). M.Q. is the recipient of a CFR fellowship (Commissariat à l'Energie Atomique), and S.P. is the recipient of a postdoctoral fellowship from the DSV/Commissariat à l'Energie Atomique. We thank D. Lemaire and B. Dublet for mass spectrometry analyses, as well as the ESRF ID14 staff for access to beamlines.

- Galán JE, Collmer A (1999) *Science* 284:1322–1328.
- Ghosh P (2004) *Mol Biol Rev* 68:771–795.
- Cornelis G (2006) *Nat Rev Microbiol* 4:811–825.
- Vance RE, Retsch A, Mekalanos JJ (2005) *Infect Immun* 73:1706–1713.
- Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW, Wiener-Kornish JP (2001) *J Infect Dis* 183:1767–1774.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2000) *Microbes Infect* 2:1051–1060.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán J, Aizawa S-I (1998) *Science* 280:602–605.
- Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galán JE, Unger VM (2004) *Science* 306:1040–1042.
- Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, Allaoui A (2001) *Mol Microbiol* 39:652–663.
- Kubori T, Sukhan A, Aizawa S-I, Galán JE (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10225–10230.
- Marlovits TC, Kubori T, Lara-Tejero M, Thomas D, Unger VM, Galán JE (2006) *Nature* 441:637–640.
- Kimbrough TG, Miller SI (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11008–11013.
- Journet L, Agrain C, Broz P, Cornelis GR (2003) *Science* 302:1757–1760.
- Deane JE, Roversi P, Cordes FS, Johnson S, Kenjale R, Daniell S, Booy F, Picking WD, Picking WL, Blocker AJ, Lea SM (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12529–12533.
- Zhang L, Wang Y, Picking WL, Picking WD, De Guzman RN (2006) *J Mol Biol* 359:322–330.
- Quinaud M, Chabert J, Faudry E, Neumann E, Lemaire D, Pastor A, Elsen S, Dessen A, Attree I (2005) *J Biol Chem* 280:36293–36300.
- Evdokimov AG, Phan J, Tropea JE, Routzahn KM, Peters III, H.K., Pokross M, Waugh DS (2003) *Nat Struct Biol* 10:789–793.
- Yip CK, Finlay BB, Strynadka NC (2005) *Nat Struct Mol Biol* 12:75–81.
- Sauer FG, Barnhart M, Choudhury D, Knight SD, Waksman G, Hultgren SJ (2000) *Curr Opin Struct Biol* 10:548–556.
- Yip CK, Strynadka NC (2006) *Trends Biochem Sci* 31:223–230.
- Day JB, Guller J, Plano GV (2000) *Infect Immun* 68:6466–6471.
- Kenjale R, Wilson J, Zenk SF, Saurya S, Picking WL, Picking WD, Blocker A (2005) *J Biol Chem* 280:42929–42937.
- Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vonderviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, Namba K (2001) *Nature* 410:331–337.
- Craig L, Volkmann N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH, Tainer JA (2006) *Mol Cell* 23:651–652.
- Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K (2003) *Nature* 424:643–650.
- Torruellas J, Jackson MW, Pennock JW, Plano GV (2005) *Mol Microbiol* 57:1719–1733.
- Otwinowski Z, Minor W (1997) *Methods Enzymol* 276:307–326.
- Schneider TR, Sheldrick GM (2002) *Acta Crystallogr D* 58:1772–1779.
- de la Fortelle E, Bricogne G (1997) *Methods Enzymol* 276:472–494.
- Morris RJ, Perrakis A, Lamzin VS (2003) *Methods Enzymol* 374:229–244.
- Navaza J (2001) *Acta Crystallogr D* 57:1367–1372.
- Brunker AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, et al. (1998) *Acta Crystallogr D* 54:905–921.

Références bibliographiques

- [Aas2002] F.E. AAS, M. WOLFGANG, S. FRYE, S. DUNHAM, C. LOVOLD et M. KOOMEY : Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Mol Microbiol.*, 46:749–60, 2002.
- [Abr1996] J.P. ABRAHAMS et A.G. LESLIE : Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 52:30–42, 1996.
- [Agr2005a] C. AGRAIN, I. CALLEBAUT, L. JOURNET, I. SORG, C. PAROZ, L.J. MOTA et G.R. CORNELIS : Characterization of a Type III secretion substrate specificity switch (T3S4) domain in YscP from *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.*, 56:54–67, 2005.
- [Agr2005b] C. AGRAIN, I. SORG, C. PAROZ et G.R. CORNELIS : Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol Microbiol.*, 57:1415–1427, 2005.
- [Aiz1996] S.I. AIZAWA : Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, 19:1–5, 1996.
- [Aiz2001] S.I. AIZAWA : Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.*, 202:157–164, 2001.
- [Ake2004] Y. AKEDA et J.E. GALÁN : Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J. Bacteriol.*, 186:2402–2412, 2004.
- [Ake2005] Y. AKEDA et J.E. GALÁN : Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, 437:911–915, 2005.

- [Auv2001] F. AUVRAY, J. THOMAS, G.M. FRASER et C. HUGHES : Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J. Mol. Biol.*, 308:221–229, 2001.
- [Ben2000] J.C. BENNETT et C. HUGHES : From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.*, 8:202–204, 2000.
- [Bie1998] D. BIEBER, S.W. RAMER, C.Y. WU, W.J. MURRAY, T. TOBE, R. FERNANDEZ et G.K. SCHOOLNIK : Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 280:2114–2118, 1998.
- [Bir2001] S. BIRTALAN et P. GHOSH : Structure of the Yersinia type III secretory system chaperone SycE. *Nat. Struct. Biol.*, 8:974–978, 2001.
- [Bis1977] G.D. BISWAS, T. SOX, E. BLACKMAN et P.F. SPARLING : Factors affecting genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.*, 129:983–992, 1977.
- [Blo1999] A. BLOCKER, P. GOUNON, E. LARQUET, K. NIEBUHR, V. CABIAUX, C. PARROT et P. SANSONETTI : The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell. Biol.*, 147:683–693, 1999.
- [Blo2001] A. et al. BLOCKER : Structure and composition of the *Shigella flexneri* needle complex, a part of its type III secretin. *Mol. Microbiol.*, 39:652–663, 2001.
- [Blo2003] A. BLOCKER, K. KOMORIYA et S. AIZAWA : Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100:3027–3030, 2003.
- [Blo2007] A.J. BLOCKER, J.E. DEANE, A. VEENENDAAL, P. ROVERSI, J.L. HODGKINSON, S. JOHNSON et S.M. LEA : What’s the point of the T3SS needle? *PNAS*, *submitted*, 2007.
- [Bod1966] G.P. BODEY, M. BUCKLEY, Y.S. SATHE et E.J. FREIREICH : Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 64:328–340, 1966.
- [Bog1998] A.A. BOGAN et K.S. THORN : Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.*, 280:1–9, 1998.
- [Bri2005] S. BRIER : Étude des interactions entre la kinésine mitotique humaine Eg5 et ses inhibiteurs. *Thèse de Doctorat*, 2005.

- [Bru1998] A.T. BRUNGER, P.D. ADAMS, G.M. CLORE, W.L. DELANO, P. GROS, R.W. GROSSE-KUNSTLEVE, J.S. JIANG, J. KUSZEWSKI, M. NILGES, N.S. PANNU, R.J. READ, L.M. RICE, T. SIMONSON et G.L. WARREN : Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D*, 54:905–921, 1998.
- [Cha2005] M. CHAMI, I. GUILVOUT, M. GREGORINI, H.W. REMIGY, S.A. MULLER, M. VALERIO, A. ENGEL, A.P. PUGSLEY et N. BAYAN : Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. *J. Biol. Chem.*, 280: 37732–37741, 2005.
- [Che1999] L.W. CHENG et O. SCHNEEWIND : *Yersinia enterocolitica* type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 274:22102–22108, 1999.
- [Chi2000] M. CHICUREL : Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature*, 408:284–286, 2000.
- [Col1996] C.M. COLLAZO et J.E. GALAN : Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.*, 64:3524–3531, 1996.
- [Col2005] R.F. COLLINS, S.A. FRYE, S. BALASINGHAM, R.C. FORD, T. TONJUM et J.P. DERRICK : Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ. *J Biol Chem.*, 280:18923–30, 2005.
- [Cor1997] GR CORNELIS et H. WOLF-WATZ : The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.*, 23:861–867, 1997.
- [Cor2000] G.R. CORNELIS et F. VAN GIJSEGEM : Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54:735–774, 2000.
- [Cor2003] F.S. CORDES, K. KOMORIYA, E. LARQUET, S. YANG, E.H. EGELMAN, A. BLOCKER et S.M LEA : Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.*, 278:17103,17107, 2003.
- [Cor2006] G. CORNELIS : The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4:811–825, 2006.
- [Cos1999] J.W. COSTERTON et P.S. Greenberg EP. STEWART : Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284:1318–1322, 1999.
- [Cow1994] K COWTAN : . *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl. Protein Cristallogr.*, pages 34–38, 1994.

- [Cra1992] T.E. CRAIGHTON : *Proteins : Structures and molecular properties*. W.H. Freeman, New York, 2nd édition, 1992.
- [Cra1998] A.M. CRAGO et V. KORONAKIS : *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol.*, 30:47–56, 1998.
- [Cra2003] L. CRAIG, R.K. TAYLOR, M.E. PIQUE, B.D. ADAIR, A.S. ARVAI, M. SINGH, S.J. LLOYD, D.S. SHIN, E.D. GETZOFF, M. YEAGER, K.T. FOREST et J.A. TAINER : Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol. Cell.*, 11:1139–1150, 2003.
- [Cra2004] L. CRAIG, M.E. PIQUE et J.A. TAINER : Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2:363–378, 2004.
- [Cra2006] L. CRAIG, N. VOLKMANN, A.S. ARVAI, M.E. PIQUE, M. YEAGER, E.H. EGELMAN et J.A. TAINER : Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol. Cell.*, 23:651–662, 2006.
- [Dae1998] S. DAEFLER et M. RUSSEL : The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol Microbiol.*, 28:1367–1380, 1998.
- [Dan2001] S.J. DANIELL, N. TAKAHASHI, R. WILSON, D. FRIEDBERG, I. ROSENSHINE, F.P. BOOY, R.K. SHAW, S. KNUTTON, G. FRANKEL et S. AIZAWA : The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.*, 3:865–871, 2001.
- [Dar2001] K.H. DARWIN et V.L. MILLER : Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.*, 20:1850–1862, 2001.
- [Dar2006] N. DARBOE, R. KENJALE, W.L. PICKING, W.D. PICKING et C.R. MIDDAUGH : Physical characterization of MxiH and PrgI, the needle component of the type III secretion apparatus from Shigella and Salmonella. *Protein Sci.*, 15:543–52, 2006.
- [Das2006] N. DASGUPTA, A. ASHARE, G.W. HUNNINGHAKE et T.L. YAHR : Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca²⁺ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect. Immun.*, 74:3334–3341, 2006.

- [Dav1998] D.G. DAVIES, M.R. PARSEK, J.P. PEARSON, B.H. IGLEWSKI, J.W. COSTERTON et E.P. GREENBERG : The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280:295–298, 1998.
- [Day2000] J.B. DAY, J. GULLER et G. V. PLANO : *Yersinia pestis* YscG is a Syc-like chaperone that directly binds YscE. *Infect. Immun.*, 68:6466–6471, 2000.
- [Dea2006] J.E. DEANE, P. ROVERSI, F.S. CORDES, S. JOHNSON, R. KENJALE, S. DANIELL, F. BOOY, W.D. PICKING, W.L. PICKING, A.J. BLOCKER et S.M. LEA : Molecular model of a type III secretion system needle: implications for host-cell sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:12529–12533, 2006.
- [DeP1971] M.L. DEPAMPHILIS et J. ADLER : Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 105:384–395, 1971.
- [Der2004] U. DEREWENDA, A. MATEJA, Y. DEVEDJIEV, K.M. ROUTZAHN, A.G. EV-DOKIMOV, Z.S. DEREWENDA et D.S. WAUGH : The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure*, 12:301–306, 2004.
- [Din2003] Z. DING, K. ATMAKURI et P.J. CHRISTIE : The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.*, 11:527–535, 2003.
- [dlF1997] E. de la FORTELLE et G. BRICOGNE : Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.*, 276:472–494, 1997.
- [Dre2002] J. DRENTH : *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer, 2002.
- [Duc1992] A. DUCRUUX et R. GIEGÉ : *Crystallisation of nucleic acids and proteins. A practical approach*. Oxford University Press, 1992.
- [Eme1970] S.U. EMERSON, K. TOKUYASU et M.I. SIMON : Bacterial flagella: polarity of elongation. *Science*, 169:190–192., 1970.
- [Esp2006] M. ESPINA, A.J. OLIVE, R. KENJALE, D.S. MOORE, S.F. AUSAR, R.W. KAMINSKI, E.V. OAKS, C.R. MIDDAGH, W.D. PICKING et W.L. PICKING : IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 74:4391–3400, 2006.
- [Fel2002] M.F. FELDMAN, S. MULLER, E. WUEST et G.R. CORNELIS : SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol. Microbiol.*, 46:1183–1197, 2002.

- [Fel2003] M.F. FELDMAN et G.R. CORNELIS : The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.*, 219:151–158, 2003.
- [Fer2006] H.U. FERRIS et T. MINAMINO : Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol.*, 12:519–526, 2006.
- [Fil2003] A. FILLOUX et I. VALLET : Biofilm :set-up and organization of a bacterial community. *Med. Sci (Paris)*, 19:77–83, 2003.
- [Fil2004] A. FILLOUX : The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1694:163–179, 2004.
- [Fol1981] W. FOLKHARD, D.A. MARVIN, T.H. WATTS et W. PARANCHYCH : Structure of polar pili from *Pseudomonas aeruginosa* strains K and O. *J. Mol. Biol.*, 149:79–93, 1981.
- [Fou2002] V. FOULONGNE, S. MICHAUX-CHARACHON, O’Callaghan D. et M. RAMUZ : Type IV secretion systems and bacterial virulence. *Med. Mal. Infect.*, 18: 439–447, 2002.
- [Fri2004] I. FRIEDLAND, G. GALLAGHER, T. KING et G.L. WOODS : Antimicrobial susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa*: data from a multicenter Intensive Care Unit Surveillance Study (ISS) in the United States. *J. Chemother.*, 16:437–441, 2004.
- [Gal1996] J.E. GALAN et J.B. BLISKA : Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 12:221–255., 1996.
- [Gal1999] J.E. GALAN et A. COLLMER : Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284:1322–1328, 1999.
- [Ger2007] R.G. GERLACH et M. HENSEL : Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007.
- [Gil1990] P. GILBERT, P.J. COLLIER et M.R. BROWN : Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34:1865–1868, 1990.
- [Gol1986] W GOLDSTEIN et G. DORING : Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134:49–56, 1986.
- [Gop2003] U. GOPHNA, E.Z. RON et D. GRAUR : Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, 312: 151–163, 2003.

- [Gou2004] J. GOURE, A. PASTOR, E. FAUDRY, J. CHABERT, A. DESSEN et I. ATTREE : The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.*, 72:4741–4750, 2004.
- [Gou2005] J. GOURE, P. BROZ, O. ATTREE, G.R. CORNELIS et I. ATTREE : Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J. Infect. Dis.*, 192:218–225, 2005.
- [Gov1986] J.R. GOVAN et G.S. HARRIS : *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol. Sci.*, 309:302–8, 1986.
- [Gre1974] S.K. GREEN, M.N. SCHROTH, Cho J.J., S.K. KOMINOS et V.B. VITANZA-JACK : Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.*, 28:987–991, 1974.
- [Guo2000] Z. GUO, D. ZHOU et P.G. SCHULTZ : Designing small-molecule switches for protein-protein interactions. *Science*, 288:2042–5, 2000.
- [Guz1991] J. GUZZO, J.M. PAGES, F. DUONG, A. LAZDUNSKI et M. MURGIER : *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.*, 173:5290–7, 1991.
- [Hen2004] I.R. HENDERSON, F. NAVARRO-GARCIA, M. DESVAUX, R.C. FERNANDEZ et D. ALA'ALDEEN : Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68:692–744, 2004.
- [Her2005] B. HERAS et J. L. MARTIN : Post crystallisation treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta cryst. D*, 61:1173–1180, 2005.
- [Hig2004] M.K. HIGGINS, E. BOKMA, E. KORONAKIS, C. HUGHES et V. KORONAKIS : Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 10:9994–9999, 2004.
- [Hoi1998] M.D. HOIBY : *Pseudomonas* in cystic fibrosis: past, present, future. *The Joseph Levy Memorial Lecture*, 1998.
- [Hoi2000] E. HOICZYK, A. ROGGENKAMP, M. REICHENBECHER, A. LUPAS et J. HEESEMANN : Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*, 22:5989–5999, 2000.
- [Hoi2001] E. HOICZYK et G. BLOBEL : Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98:4669–4674, 2001.

- [Hol2001] I.A. HOLDER, A.N. NEELY et D.W. FRANK : PcrV immunization enhances survival of burned *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Infect. Immun.*, 69:5908–5910, 2001.
- [Hom1985] M. HOMMA et T. IINO : Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 162:183–189, 1985.
- [Hue1998] C.J. HUECK : Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:379–433, 1998.
- [Ike1984] T. IKEDA, R. KAMIYA et S. YAMAGUCHI : In vitro polymerization of flagellin excreted by a short-flagellum *Salmonella typhimurium* mutant. *J. Bacteriol.*, 159:787–789, 1984.
- [Ima2007] K. IMADA, T. MINAMINO, A. TAHARA et K. NAMBA : Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104:485–490, 2007.
- [Jan1994] J. JANIN et M. DELEPIERRE : *Biologie Structurale. Principes et méthodes biophysiques*. Hermann, 1994.
- [Joh2006a] S. JOHNSON, P. ROVERSI, M. ESPINA, A. OLIVE, J.E. DEANE, S. BIRKET, T. FIELD, W.D. PICKING, A.J. BLOCKER, E.E. GALYOV, W.L. PICKING et S.M. LEA : Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J. Biol. Chem.*, 282:4035–4044, 2006.
- [Joh2006b] T.L. JOHNSON, J. ABENDROTH, W.G. HOL et M. SANDKVIST : Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.*, 255:175–86, 2006.
- [Jou2003] L. JOURNET, C. AGRAIN, P. BROZ et G.R. CORNELIS : The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science*, 302:1757–1760, 2003.
- [Kai2000] D. KAISER : Bacterial motility: how do pili pull? *Curr. Biol.*, 10:777–780, 2000.
- [Kei2001] D.W. KEIZER, C.M. SLUPSKY, M. KALISIAK, A.P. CAMPBELL, M.P. CRUMP, P.A. SASTRY, B. HAZES, R.T. IRVIN et B.D. SYKES : Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: implications for the assembly of pili. *J. Biol. Chem.*, 276:24186–24193, 2001.
- [Ken2005] R. KENJALE, J. WILSON, S.F. ZENK, S. SAURYA, W.L. PICKING, W.D. PICKING et A. BLOCKER : The needle component of the type III secretion of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J. Biol. Chem.*, 280:42929–42937, 2005.

- [Kip2006] E. KIPNIS, T. SAWA et J. WIENER-KRONISH : Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.*, 36:78–91, 2006.
- [Knu1998] S. KNUTTON, I. ROSENSHINE, M.J. PALLAN, I. NISAN, B.C. NEVES, C. BAIN, C. WOLFF, G. DOUGAN et G. FRANKEL : A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.*, 17:2166–2176, 1998.
- [Kon1995] M.W. KONSTAN, P.J. BYARD, C.L. HOPPEL et P.B. DAVIS : Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.*, 332:848–854, 1995.
- [Kor1989] V. KORONAKIS, E. KORONAKIS et C. HUGHES : Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.*, 8:595–605, 1989.
- [Kor2000] V. KORONAKIS, A. SHARFF, E. KORONAKIS, B. LUISI et C. HUGHES : Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405:914–919, 2000.
- [Kos1997] M. KOSTER, W. BITTER, H. de COCK, A. ALLAOUI, G.R. CORNELIS et J. TOMMASSEN : The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.*, 26:789–797, 1997.
- [Kub1998] T. KUBORI, Y. MATSUSHIMA, D. NAKAMURA, J. URALIL, M. LARA-TEJERO, A. SUKHAN, J.E. GALAN et Aizawa SI. : Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, 280:602–605, 1998.
- [Kub2000] T. KUBORI, A. SUKHAN, S.I. AIZAWA et J.E. GALAN : Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97:11008–11013, 2000.
- [Köh2004] R. KÖHLER, K. SCHAFER, S. MULLER, G. VIGNON, K. DIEDERICH, P. PHILIPPSEN, A. Ringler, A.P. PUGSLEY, A. ENGEL et W. WELTE : Structure and assembly of the pseudopilin PulG. *Mol. Microbiol.*, 54:647–64, 2004.
- [Lar1974] S.H. LARSEN, R.W. READER, E.N. KORT, W.W. TSO et J. ADLER : Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature*, 249:74–77, 1974.
- [Lat1985] E. LATTMAN : Diffraction methods for biological macromolecules. Use of the rotation and translation functions. *Methods Enzymol.*, 115:55–77, 1985.

- [Lau2007] B. LAUDET, R. PRUDENT, O. FILHOL et C. COCHET : Des agents thérapeutiques ciblant des interactions protéine-protéine: mythe ou réalité? *Med. Sci. (Paris)*, 23:273–278, 2007.
- [LB2006] R. LE BERRE, K. FAURE, S. NGUYEN, M. PIERRE, F. ADER et B. GUERY : Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*? *Med. Mal. Infect.*, 36:349–357, 2006.
- [Lee2005] V.T. LEE, R.S. SMITH, B. TUMMLER et S. LORY : Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect. Immun.*, 73:1695–1705, 2005.
- [Leo2005] G.A. LEONARD, G. SAINZ, M.M. de BACKER et McSweeney S. : Automatic structure determination based on the single-wavelength anomalous diffraction technique away from an absorption edge. *Acta Crystallogr D*, 61:388–396, 2005.
- [Lis2002] P.D. LISTER : Chromosomally-encoded resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*: therapeutic implications. *Am. J. Pharmacogenomics.*, 2:235–343, 2002.
- [Luo2001] Y. LUO, M.G. BERTERO, E.A. FREY, R.A. PFUETZNER, M.R. WENK, L. CREAGH, S.L. MARCUS, D. LIM, F. SICHERI, C. KAY, C. HAYNES, B.B. FINLAY et N.C. STRYNADKA : Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat. Struct. Biol.*, 8:1031–1036, 2001.
- [Lyc2000] J.B. LYCZAK, C.L. CANNON et G.B. PIER : Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.*, 2:1051–1060, 2000.
- [Mac1984] R.M. MACNAB et S. AIZAWA : Bacterial motility and the bacterial flagellar motor. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13:51–83, 1984.
- [Mac1996] R.M. MACNAB : *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular biology*. W.H. Freeman, New York, neidhardt édition, 1996.
- [Mag2002] J. MAGDALENA, A. HACHANI, M. CHAMEKH, N. JOUIHRI, P. GOUNON, A. BLOCKER et A. ALLAOUI : Spa32 regulates a switch in substrate specificity of the type III secretion of *Shigella flexneri* from needle components to Ipa proteins. *J. Bacteriol.*, 184:3433–3441, 2002.
- [Mah2003] T.F. MAH, B. PITTS, B. PELLOCK, G.C. WALKER, P.S. STEWART et G.A. O'TOOLE : A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426:306–310, 2003.

- [Mai2002] B. MAIER, L. POTTER, M. SO, C.D. LONG, H.S. SEIFERT et M.P. SHEETZ : Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99:16012–7, 2002.
- [Mai2003] E.R. MAIN, Y. XIONG, M.J. COCCO, L. D’ANDREA et L. REGAN : Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure*, 11:497–508, 2003.
- [Mar2004] T.C. MARLOVITS, T. KUBORI, A. SUKHAN, D.R. THOMAS, J.E. GALAN et V.M. UNGER : Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, 306:1040–1042, 2004.
- [Mar2006] T.C. MARLOVITS, T. KUBORI, M. LARA-TEJERO, D. THOMAS, V.M. UNGER et J.E. GALAN : Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature*, 441:637–640, 2006.
- [Mat1968] B.W.J. MATTHEWS : Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, 33:491–497, 1968.
- [Mav2002] M. MAVRIS, P.J. SANSONETTI et C. PARSOT : Identification of the cis-acting site involved in activation of promoters regulated by activity of the type III secretion apparatus in *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.*, 184:6751–6759, 2002.
- [McP1995] A. MCPHERSON, A.J. MALKIN et Y.G. KUZNETSOV : The science of macromolecular crystallization. *Structure*, 3:759–768, 1995.
- [Mer2000] A.J. MERZ, M. SO et M.P. SHEETZ : Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407:98–102, 2000.
- [Mic1990] T. MICHIELS, P. WATTIAU, R. BRASSEUR, J.M. RUYSSCHAERT et G.R. CORNELIS : Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 58:2840–2849, 1990.
- [Mim1995] Y. MIMORI, I. YAMASHITA, K. MURATA, Y. FUJIYOSHI, K. YONEKURA, C. TOYOSHIMA et K. NAMBA : The structure of the R-type straight flagellar filament of *Salmonella* at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.*, 249:69–87, 1995.
- [Min1999] T. MINAMINO et R.M. MACNAB : Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.*, 181:1388–1394, 1999.
- [Miy1995] S. MIYAZAKI, T. MATSUMOTO, K. TATEDA, A. OHNO et K. YAMAGUCHI : Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J. Med. Microbiol.*, 43:169–75, 1995.

- [Mor2003] R.J. MORRIS, A. PERRAKIS et V.S. LAMZIN : ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Methods Enzymol.*, 374:229–244, 2003.
- [Mot2005] L.J. MOTA, L. JOURNET, I. SORG, C. AGRAIN et G.R. CORNELIS : Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science*, 307:1278, 2005.
- [Mot2006] L.J. MOTA : Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol.*, 14:197–200, 2006.
- [Mou2006] J.D. MOUGOUS, M.E. CUFF, M. ZHOU, C.A. GIFFORD, A.L. GOODMAN, G. JOACHIMIAK, C.L. ORDONEZ, S. LORY, T. WALZ, A. JOACHIMIAK et J.J. MEKALANOS : A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312:1526–1530, 2006.
- [Mue2005] C.A. MUELLER, P. BROZ, S.A. MULLER, P. RINGLER, F. ERNE-BRAND, I. SORG, M. KUHN, A. ENGEL et G.R. CORNELIS : The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*, 310:674–676, 2005.
- [Mul2006] S.A. MULLER, C. POZIDIS, R. STONE, C. MEESTERS, M. CHAMI, A. ENGEL, A. ECONOMOU et H. STAHLBERG : Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol. Microbiol.*, 61:119–125, 2006.
- [Mur2002] S. MURAKAMI, R. NAKASHIMA, E. YAMASHITA et A. YAMAGUCHI : Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 419:587–593, 2002.
- [Nav2001] J. NAVAZA : Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr. D*, 57:1367–1372, 2001.
- [Ney1999] C. NEYT et G.R. CORNELIS : Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol. Microbiol.*, 33:971–981, 1999.
- [Nil1997] M.L. NILLES, A.W. WILLIAMS, E. SKRZYPEK et S.C. STRALEY : *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca²⁺ response. *J. Bacteriol.*, 179:1307–1316, 1997.
- [O'B1972] E.J. O'BRIEN et P.M. BENNETT : Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*. *J. Mol. Biol.*, 70:133–152, 1972.

- [O'T1998] G.A. O'TOOLE et R. KOLTER : Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 28:449–461, 1998.
- [Otw1997] Z. OTWINOWSKI et W. MINOR : Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*, 276:307–326, 1997.
- [Pag2002] A.L. PAGE et C. PARSOT : Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol. Microbiol.*, 46:1–11, 2002.
- [Pal2003] M.J. PALLAN, M.S. FRANCIS et K. FUTTERER : Tetratricopeptide-like repeats in type-III-secretion chaperones and regulators. *FEMS Microbiol. Lett.*, 223:53–60, 2003.
- [Par1995] H.E. PARGE, K.T. FOREST, M.J. HICKEY, D.A. CHRISTENSEN, E.D. GETZOFF et J.A. TAINER : Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature*, 378:32–38, 1995.
- [Pas2005] A. PASTOR, J. CHABERT, M. LOUWAGIE, J. GARIN et I. ATTREE : PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol. Lett.*, 253:95–101, 2005.
- [Pav1978] O.R. PAVLOVSKIS, B.H. IGLEWSKI et M. POLLACK : Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in experimental mouse infections: adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect. Immun.*, 19:29–33, 1978.
- [Pea2003] C.R. PEABODY, Y.J. CHUNG, M.R. YEN, D. VIDAL-INGIGLIARDI, A.P. PUGSLEY et M.H. Jr. SAIER : Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149:3051–3072, 2003.
- [Phi2007] A.V. PHILIPOVSKIY et S.T. SMILEY : Vaccination with Live *Yersinia pestis* Primes CD4 and CD8 T Cells That Synergistically Protect against Lethal Pulmonary *Y. pestis* Infection. *Infect. Immun.*, 75:878–885, 2007.
- [Poo2001] K. POOLE et R. SRIKUMAR : Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3:255–264, 2001.
- [Poz2003] C. POZIDIS, A. CHALKIADAKI, A. GOMEZ-SERRANO, H. STAHLBERG, I. BROWN, A.P. TAMPAKAKI, A. LUSTIG, G. SIANIDIS, A.S. POLITOU, A. ENGEL, N.J. PANOPOULOS, J. MANSFIELD, A.P. PUGSLEY, S. KARAMANOU et A. ECONOMOU : Type III protein translocase: HrcN is a peripheral

ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.*, 278:25816–25824, 2003.

- [Pre1996] C.A.K. PRESTON, A.K. KHOURY, G. REID et J.W. BRUCE, A.W. and Costerton : *Pseudomonas aeruginosa* biofilms are more susceptible to ciprofloxacin than to tobramycin. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 7:251–256, 1996.
- [Qui2005] M. QUINAUD, J. CHABERT, E. FAUDRY, E. NEUMANN, D. LEMAIRE, A. PASTOR, S. ELSSEN, A. DESSEN et Attree I. : The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 280:36293–36300, 2005.
- [Qui2007] M. QUINAUD, S. PLE, V. JOB, C. CONTRERAS-MARTEL, J.P. SIMORRE, I. ATTREE et A. DESSEN : Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104:7803–7808, 2007.
- [Rah2000] L.G. RAHME, F.M. AUSUBEL, H. CAO, E. DRENKARD, B.C. GOUMNEROV, G.W. LAU, S. MAHAJAN-MIKLOS, J. PLOTNIKOVA, M.W. TAN, J. TSONGALLIS, C.L. WALENDZIEWICZ et R.G. TOMPKINS : Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2000:8815–8821, 2000.
- [Rem2004] H. REMAUT et G. WAKSMAN : Structural biology of bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14:161–70, 2004.
- [Ros1994] R. ROSQVIST, K.E. MAGNUSSON et H. WOLF-WATZ : Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.*, 13:964–972, 1994.
- [Rud1995] T. RUDEL, I. SCHEURERPFUG et T.F. MEYER : *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature*, 373:357–359, 1995.
- [Sam2001] F.A. SAMATEY, K. IMADA, S. NAGASHIMA, F. VONDERVISZT, T. KUMASAKA, M. YAMAMOTO et K. NAMBA : Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410:331–337, 2001.
- [Sar1998] M.R. SARKER, C. NEYT, I. STAINIER et G.R. CORNELIS : The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.*, 180:1207–1214, 1998.
- [Saw1999] T. SAWA, T.L. YAHR, M. OHARA, K. KURAHASHI, M.A. GROPPER, J.P. WIENER-KRONISH et D.W. FRANK : Active and passive immunization with

the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat. Med.*, 5:392–398, 1999.

- [Say2004] S.L. SAYNER, D.W. FRANK, J. KING, H. CHEN, J. VANDEWAA et T. STEVENS : Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ. Res.*, 95:196–203, 2004.
- [Sch2000] C. SCHEUFLE, A. BRINKER, G. BOURENKOV, S. PEGORARO, L. MORODER, H. BARTUNIK, F.U. HARTL et I. MOAREFI : Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, 101:199–210, 2000.
- [Sch2002] T.R. SCHNEIDER et G.M. SHELDRICK : Substructure solution with SHELXD. *Acta Cryst. D*, 58:1772–1779, 2002.
- [Sch2003] G. SCHOEHN, A.M. DI GUILMI, D. LEMAIRE, I. ATTREE, W. WEISSENHORN et A. DESSEN : Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.*, 22:4957–4967, 2003.
- [Sha2004] C.M. SHAVER et A.R. HAUSER : Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect. Immun.*, 72:6969–6977, 2004.
- [Shi2007] S. SHIBATA, N. TAKAHASHI, F.F. CHEVANCE, J.E. KARLINSEY, K.T. HUGHES et S. AIZAWA : FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol. Microbiol.*, 64:1404–1415, 2007.
- [Sor] I. SORG et R.G. CORNELIS : Résultat non publié régulation aiguille yscf. Communication Interne.
- [Ste2001] C.E. STEBBINS et J.E. GALÁN : Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, 414:77–81, 2001.
- [Sto2000] C.K. STOVER, X.Q. PHAM, A.L. ERWIN, S.D. MIZOGUCHI, P. WARRENER, M.J. HICKEY, F.S. BRINKMAN, W.O. HUFNAGLE, D.J. KOWALIK, M. LAGROU, R.L. GARBER, L. GOLTRY, E. TOLENTINO, S. WESTBROCK-WADMAN, Y. YUAN, L.L. BRODY, S.N. COULTER, K.R. FOLGER, A. KAS, K. LARBIG, R. LIM, K. SMITH, D. SPENCER, G.K. WONG, Z. WU, I.T. PAULSEN, J. REIZER, M.H. SAIER, R.E. HANCOCK, S. LORY et M.V. OLSON : Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406:959–964, 2000.

- [Suk2001] A. SUKHAN, T. KUBORI, J. WILSON et J.E. GALAN : Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex. *J. Bacteriol.*, 183:1159–1167, 2001.
- [Suz1978] T. SUZUKI, T. IINO, T. HORIGUCHI et S. YAMAGUCHI : Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 133:904–915, 1978.
- [Suz1998] H. SUZUKI, K. YONEKURA, K. MURATA, T. HIRAI, K. OOSAWA et K. NAMBA : A structural feature in the central channel of the bacterial flagellar FliF ring complex is implicated in type III protein export. *J. Struct. Biol.*, 124:104–114, 1998.
- [Suz2004] H. SUZUKI, K. YONEKURA et K. NAMBA : Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. *J Mol Biol.*, 337:105–113, 2004.
- [Swi2005] W. SWIETNICKI, B.S. POWELL et J. GOODIN : *Yersinia pestis* Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague. *Protein Expr. Purif.*, 42:166–172, 2005.
- [Sza1983] M. SZAFF, N. HOIBY et E.W. FLENSBORG : Frequent antibiotic therapy improves survival of cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Acta Paediatr. Scand.*, 72:651–657, 1983.
- [Tam2000] K. TAMANO, S. AIZAWA, E. KATAYAMA, T. NONAKA, S. IMAJOH-OHMI, A. KUWAE, S. NAGAI et C. SASAKAWA : Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.*, 19:3876–3887, 2000.
- [Tam2004] A.P. TAMPAKAKI, V.E. FADOULOGLOU, A.D. GAZI, N.J. PANOPOULOS et M. KOKKINIDIS : Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.*, 6:805–816, 2004.
- [Tho1999] D.R. THOMAS, D.G. MORGAN et D.J. DEROSIER : Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 96:10134–101139, 1999.
- [Tho2001] D. THOMAS, D.G. MORGAN et D.J. DEROSIER : Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J. Bacteriol.*, 183:6404–6412, 2001.
- [Tho2006] D.R. THOMAS, N.R. FRANCIS, C. XU et D.J. DEROSIER : The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant

- of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 188:7039–7048, 2006.
- [Tor2005] J. TORRUELLAS, M.W. JACKSON, J.W. PENNOCK et G.V. PLANO : The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol. Microbiol.*, 57:1719–1733, 2005.
- [Tro2005] P. TROISFONTAINES et G.R. CORNELIS : Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)*, 20:326–339, 2005.
- [Vas1986] M.L. VASIL : *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.*, 108:800–805, 1986.
- [Vee2007] A.K. VEENENDAAL, J.L. HODGKINSON, L. SCHWARZER, D. STABAT, S.F. ZENK et A.J. BLOCKER : The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol. Microbiol.*, 63: 1719–30, 2007.
- [VG1995] F. VAN GIJSEGEM, C. GOUGH, C. ZISCHEK, E. NIQUEUX, M. ARLAT, S. GENIN, P. BARBERIS, S. GERMAN, P. CASTELLO et C. BOUCHER : The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol. Microbiol.*, 15:1095–1114, 1995.
- [Vou2001] R. VOULHOX, G. BALL, B. IZE, M.L. VASIL, A. LAZDUNSKI, L.F. WU et Filloux A. : Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.*, 20:6735–6741, 2001.
- [Wal1982] J.E. WALKER, M. SARASTE, M. J. RUNSWICK et N.J. GAY : Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, 1:945–951, 1982.
- [Wan2007] Y. WANG, A.N. OUELLETTE, C.W. EGAN, T. RATHINAVELAN, W. IM et R.N. DE GUZMAN : Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL, and MxiH. *J. Mol. Biol.*, 371:1304–1314, 2007.
- [Wat1993] P. WATTIAU et G.R. CORNELIS : SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ome secretion of YopE. *Mol Microbiol.*, 8:123–131, 1993.

- [Wat1994] P. WATTIAU, B. BERNIER, P. DESLEE, T. MICHIELS et G.R. CORNELIS : Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91:10493–10497, 1994.
- [Wat1996] P. WATTIAU, S. WOESTYN et G.R. CORNELIS : Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*, 20:255–262, 1996.
- [Win2002] S.C. WINANS : Bacterial esperanto. *Nat. Struct. Biol.*, 9:83–84, 2002.
- [Wol2003] M.C. WOLFGANG, B.R. KULASEKARA, X. LIANG, D. BOYD, K. WU, Q. YANG, C.G. MIYADA et S. LORY : Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100:8484–8489, 2003.
- [Won1995] W.Y. WONG, A.P. CAMPBELL, C. MCINNES, B.D. SYKES, W. PARANCHYCH, R.T. IRVIN et R.S. HODGES : Structure-function analysis of the adherence-binding domain on the pilin of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and KB7. *Biochemistry.*, 34:12963–12972, 1995.
- [Yam1998] I. YAMASHITA, K. HASEGAWA, H. SUZUKI, F. VONDERVISZT, Y. MIMORI-KIYOSUE et K. NAMBA : Structure and switching of bacterial flagellar filaments studied by X-ray fiber diffraction. *Nat. Struct. Biol.*, 5:125–132, 1998.
- [Ye2004] X. YE, P.K. O’NEIL, A.N. FOSTER, M.J. GAJDA, J. KOSINSKI, M.A. KURROWSKI, J.M. BUJNICKI, A.M. FRIEDMAN et C. BAILEY-KELLOGG : Probabilistic cross-link analysis and experiment planning for high-throughput elucidation of protein structure. *Prot. Sci.*, 13:3298–313, 2004.
- [Yin2004] H. YIN et A.D. HAMILTON : Terephthalamide derivatives as mimetics of the helical region of Bak peptide target Bcl-xL protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14:1375–1379, 2004.
- [Yin2005] H. YIN, G.I. LEE, K.A. SEDEY, J.M. RODRIGUEZ, H.G. WANG, S.M. SEBTI et A.D. HAMILTON : Terephthalamide derivatives as mimetics of helical peptides: disruption of the Bcl-x(L)/Bak interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:5463–5468, 2005.
- [Yip2005a] C.K. YIP, B.B. FINLAY et N.C. STRYNADKA : Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12:75–81, 2005.
- [Yip2005b] C.K. YIP, T.G. KIMBROUGH, H.B. FELISE, M. VUCKOVIC, N.A. THOMAS, R.A. PFUETZNER, E.A. FREY, B.B. FINLAY, S.I. MILLER et N.C. STRY-

- NADKA : Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature*, 435:702–707, 2005.
- [Yip2006] C.K. YIP et N.C. STRYNADKA : New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem. Sci.*, 31:223–230, 2006.
- [Yon2000] K. YONEKURA, S. MAKI, D.G. MORGAN, D.J. DEROSIER, F. VONDERVISZT, K. IMADA et K. NAMBA : The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science*, 290:2148–2152, 2000.
- [Yon2003] K. YONEKURA, S. MAKI-YONEKURA et K. NAMBA : Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424: 643–650, 2003.
- [You2003] H.S. YOUNG, H. DANG, Y. LAI, D.J. DEROSIER et S. KHAN : Variable symmetry in *Salmonella typhimurium* flagellar motors. *Biophys. J.*, 84:571–577, 2003.
- [Zar2007] R. ZARIVACH, M. VUCKOVIC, W. DENG, B.B. FINLAY et N.C. STRYNADKA : Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14:131–137, 2007.
- [Zha2006] L. ZHANG, Y. WANG, W.L. PICKING, W.D. PICKING et R.N. DE GUZMAN : Solution structure of monomeric BsaL, the type III secretion needle protein of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Mol. Biol.*, 359:322–330, 2006.
- [Zha2007] L. ZHANG, Y. WANG, A.J. OLIVE, N.D. SMITH, W.D. PICKING, R.N. DE GUZMAN et W.L. PICKING : Identification of the MxiH needle protein residues responsible for anchoring IpaD to the type III secretion needle tip. *J. Biol. Chem.*, 2007.

Résumé :

Le système de sécrétion de type III est présent chez plusieurs pathogènes à Gram négatif chez qui cette véritable nanomachine est impliquée dans le transport de molécules de virulence directement des bactéries vers le cytoplasme des cellules-cible. *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie dont l'aiguille de sécrétion de type III est étudiée dans cette thèse, est responsable de nombreuses maladies nosocomiales ainsi que d'infections chez les patients atteints de mucoviscidose. Ce système de sécrétion est composé d'une base ancrée dans la double membrane bactérienne et d'une structure creuse en forme d'aiguille qui est un homopolymère d'une petite protéine.

Dans le cytoplasme bactérien, la protéine PscF qui forme l'aiguille de type III chez *P. aeruginosa* est stabilisée avant sa sécrétion par 2 chaperonnes distinctes ; PscE et PscG. Ceci est nécessaire à la fonctionnalité du système de sécrétion de type III.

La structure cristallographique à 2.0 Å de résolution du complexe hétérotrimérique PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG révèle que le domaine C-terminal de la protéine de l'aiguille PscF, impliqué dans le processus de polymérisation, est enfoui dans une cavité hydrophobe de la protéine PscG repliée de façon semblable à un domaine TPR. Ceci montre que le repliement macromoléculaire nécessaire pour stabiliser la protéine de l'aiguille de type III est différent de celui décrit chez le pilus de type IV et le flagelle. Les résidus qui précèdent l'hélice C-terminale de PscF sont maintenus dépliés par des interactions hydrophobes avec PscG. Ainsi, avant sa sécrétion, PscF est maintenue partiellement dépliée par ses chaperonnes. Elle transiterait ensuite sous forme partiellement dépliée à travers l'aiguille avant de se replier lors de sa polymérisation.

La rupture des interactions spécifiques entre PscG et PscF entraîne une nette baisse de la cytotoxicité de la bactérie envers une lignée de macrophages, ce qui indique que cet hétérotrimère essentiel, qui possède des homologues chez une grande variété de pathogènes, est une cible thérapeutique attractive pour le développement de nouveaux médicaments.

Abstract :

Type III secretion systems are found in several Gram-negative bacteria. These nanomachines are involved in the transport of virulence effectors directly into the cytoplasm of target cells. *Pseudomonas aeruginosa*, whose type III secretion needle is studied here, is the causative agent of a large number of nosocomial and chronic infections in cystic fibrosis patients. This system is composed of a base anchored in the double bacterial membrane and a hollow needle formed by a single polymerized protein (PscF in *P. aeruginosa*).

Within the bacterial cytoplasm, PscF requires two distinct chaperones for stabilisation before its secretion, without which the entire system is nonfunctional.

The 2.0 Å X-ray crystal structure of the PscE:PscF⁵⁵⁻⁸⁵-PscG ternary complex reveals that the C-terminus of the needle protein PscF, which is essential for needle polymerisation, is engulfed within the hydrophobic groove of the TPR-like molecule PscG. This indicates that the macromolecular scaffold necessary to stabilize the needle protein is totally distinct from chaperoned complexes between pilus- or flagellum-forming molecules.

Disruption of specific PscG:PscF interactions leads to impairment of bacterial cytotoxicity toward macrophages, indicating that this essential heterotrimer, which possesses homologs in a wide variety of pathogens, is an attractive therapeutic target for the development of novel drugs.